



Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Présentée et soutenue par :

Julie BELLIERE

le vendredi 24 octobre 2014

Titre :

Inflammation associée à l'agression rénale aiguë
- contribution de la polarisation macrophagique
- visualisation de VCAM-1 en imagerie moléculaire

École doctorale et discipline ou spécialité :

ED BSB : Immunologie

Unité de recherche :

INSERM U1048 I2MC Equipe 12

Directeur(s) de Thèse :

Docteur Jean-Loup Bascands
Professeur Dominique Chauveau

Jury :

Professeur Roland Liblau, Président
Professeur Eric Rondeau, Rapporteur
Docteur Valérie Lecureur, Rapporteur
Docteur Jean-Loup Bascands, Directeur

Remerciements

Je tiens à remercier Monsieur le Pr Liblau d'avoir accepté de présider ce jury de thèse.

Je remercie vivement mes rapporteurs, Monsieur le Pr Rondeau et Mme Lecureur d'avoir accepté de juger mon travail, et de l'attention qu'ils ont porté à la lecture du manuscrit.

Je remercie chaleureusement le Dr Jean-Loup Bascands, qui m'a accueillie au sein de son laboratoire, et qui a dirigé ce travail, pour son précieux soutien durant ces trois années.

J'exprime toute ma reconnaissance au Pr Chauveau qui a co-dirigé ce travail, pour son encadrement, ses encouragements, et son enseignement clinique en Néphrologie.

Toute ma gratitude va au comité pédagogique de l'Ecole de l'INSERM, aux Pr Chottard, Pr Ascher, Dr Amblard, qui m'ont accordé un suivi personnalisé depuis 2003.

Mes remerciements s'adressent également à Maxime Gauberti et à l'ensemble de l'unité 919 pour leur précieuse collaboration.

Je souhaite remercier le Pr Pipy pour ses conseils tout au long du projet, ainsi que le Dr Guilbeau-Frugier pour sa contribution au travail expérimental.

Dédicaces

A Jean-Loup,

Ton encadrement a été très instructif. Merci pour la confiance et la liberté que tu m'as accordées à plusieurs reprises. Ton optimisme a été d'un grand secours dans les moments difficiles, dont j'ai néanmoins compris qu'ils étaient inhérents à la démarche scientifique.

A Joost,

Bénéficier de ton enseignement a été une grande chance. Tes remarques ont été décisives dans les orientations de ce voyage scientifique. Heel erg bedankt.

A Audrey,

Youyou are the sunshine of the lab... Merci pour tout ce que tu m'as transmis. Tu as été une source d'énergie renouvelée. Longue vie à notre amitié !

A Cécile,

Se retrouver dans l'univers de la recherche était déjà palpitant, mais le vivre à tes côtés a rendu cette expérience très agréable. Sans ton aide, rien n'aurait été possible !

A tous les membres de l'équipe 12,

Benjamin (le talentueux), Béné, Eric, Jean-Sébastien, Julie, Laure, Marion, Sandra, Simon, Stan, Théo. Par extension au RdC du L3 Colette, Nelly, et les collègues de l'équipe 8.

Aux pépites servies sur les plateaux,

Cytométrie : Alexia et Christiane, arc en ciel aux mille couleurs, ce projet est devenu le nôtre. Merci pour les conseils, la formation, les heures d'analyse et de discussion. Merci pour votre bienveillance, votre écoute hors du commun ! *Get-TQ* : Jean-José et Fred, la boîte à surprises, amplifications, RTneg, où innovation et expertise se rejoignent. Un problème ? Une solution existe ! Et de surcroît, on discute, on mange, on voyage, et la confiance revient. *Bioinformatics* : Jason, thanks for your patience and collaboration.

Aux néphrologues toulousains,

Stan pour ton expertise et tes remarques si constructives. L'ensemble des internes, médecins et personnels du Département de Néphrologie et Transplantation d'Organes du CHU de Rangueil, qui ont continué à m'accompagner durant les gardes et les formations. Merci de m'avoir permis de ne pas perdre le chemin de la clinique.

Aux irréductibles grenoblois,

Sandra, Clément, Delphine et Xavier pour votre soutien inconditionnel, à distance ou pas ! Une bouffée d'oxygène à chaque fois que je vous revois.

A mes parents,

Merci, parce que vous avez tout fait pour moi.

A Gilles,

Merci, en souvenir de notre doux passé, en hommage à notre présent souriant, et pour notre futur qui grandit.

Résumé

Les données épidémiologiques ont établi qu'une agression rénale aiguë (ARA) pouvait favoriser l'émergence d'une maladie rénale chronique. Certains phénomènes immunologiques y contribuent. Parmi les événements mis en jeu, la réponse inflammatoire est un déterminant pronostique majeur de l'apparition de lésions de fibrose et implique notamment les macrophages (MØ), cellules hétérogènes et plastiques, dont le phénotype s'établit entre deux extrêmes : M1 (classiquement activé, pro-inflammatoire) ou M2 (alternativement activé, réparateur). L'ARA secondaire à une rhabdomyolyse (lésion du muscle strié squelettique), est une situation clinique fréquente, principalement expliquée par le rôle délétère sur le tubule rénal de la myoglobine libérée par le muscle. Dans la situation d'ARA expérimentale succédant à une rhabdomyolyse, nos objectifs étaient : (i) de décrire la polarisation et le rôle des MØ, où l'infiltration tissulaire rénale par les MØ a été montrée, sans que leur fonction biologique n'ait été définie; (ii) de caractériser les conséquences morphologiques et fonctionnelles tardives.

Alors que les données histologiques humaines sont parcellaires dans la rhabdomyolyse, nous avons mis en évidence un infiltrat significatif de MØ sur une biopsie rénale d'un patient admis après une rhabdomyolyse d'origine toxique. Nous avons confirmé cette donnée dans le modèle murin de rhabdomyolyse induite par le glycérol. Le phénotype des MØ est apparu hétérogène (ces cellules présentant une grande diversité au-delà de leur identité). Par cytométrie en flux, nous avons établi qu'en situation d'homéostasie, les MØ sont de type R2 (F4/80^{hi}CD11b⁺). A J2 après rhabdomyolyse, une recrudescence de MØ de type R1 (F4/80^{lo}CD11b^{hi}) est notée, alors qu'à J8, le phénotype dominant redevient R2 (F4/80^{hi}CD11b⁺), mais enrichi en CD206 (marqueur de réparation, M2). L'exposition à la myoglobine *in vitro* entraîne l'expression par les cellules rénales de cytokines recrutant les MØ, et une polarisation « mixte » des MØ, simultanément M1 et M2. Pour mieux caractériser les états de transition des MØ, une étude transcriptionnelle a été réalisée à l'échelle de la cellule isolée *in vivo*. Nous montrons que la rhabdomyolyse est une situation d'activation des MØ, et que R1 et R2 ont des caractéristiques bien distinctes : alors que les R1 expriment des cibles de l'inflammation et des marqueurs M2 dont la fibronectine, les R2 expriment des cibles de réparation et d'inflammation suggérant un phénotype M2b. Enfin, nous avons réalisé des études fonctionnelles en déplaçant les MØ avec du clodronate liposomal (CL). Le traitement par CL réduit la mortalité liée à la rhabdomyolyse et la sévérité de l'ARA en matière de structure et de fonction. La déplétion de la population R1 s'accompagne d'une réduction des cytokines pro-inflammatoires (CCL-2, CCL-7) et de certains composants de la matrice extra-cellulaire (fibronectine, collagène). A long terme, un et sept mois après rhabdomyolyse, nous observons des séquelles chroniques d'ARA, ce qui n'avait jamais été observé. Le fait de réduire l'inflammation initiale avec le CL se révèle bénéfique. Ainsi, nous décrivons pour la première fois l'implication des MØ dans les lésions rénales liée à une rhabdomyolyse.

En parallèle de ce travail, nous nous sommes intéressés aux molécules d'adhésion endothéliales qui permettent l'extravasation des leucocytes (dont les MØ) dans les tissus agressés, en particulier VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1). Nous avons appliqué une technique non-invasive de mesure de l'inflammation par imagerie moléculaire anti VCAM-1 à l'étude de différents modèles d'ARA et de maladie rénale chronique (note technique en annexe).

En résumé, ce travail établit clairement l'importance des phénomènes inflammatoires et le rôle des MØ dans une situation d'ARA expérimentale. L'usage précoce de modulateurs de l'inflammation prévient l'installation de séquelles définitives.

Abstract

Immune processes and the inflammatory response influence the prognosis of acute kidney injury (AKI). In particular, the macrophage (MØ) polarization status, whereby MØs are classified as either M1 (classically activated, pro-inflammatory) or M2 (alternatively activated, wound-healing), controls the long-term outcome of AKI, favouring kidney regeneration or atrophy. Severe damage of skeletal muscle, referred to as rhabdomyolysis, is the cause of 10% of AKI cases and AKI complicates 13-50% of traumatic or non-traumatic rhabdomyolysis. Previously, hypovolemia and the direct nephrotoxic effect of myoglobin were thought to be the main factors involved in rhabdomyolysis-induced AKI. Since MØs are known to participate in kidney injuries under numerous other contexts and have been suspected to populate the kidney in human and murine rhabdomyolysis, we set out to investigate the role of MØs in rhabdomyolysis-induced AKI.

We detected, for the first time, a significant renal MØ infiltration in a patient diagnosed with rhabdomyolysis-induced AKI with antibodies against CD68. Using a mouse model with intramuscular glycerol injections, diverse renal MØ phenotypes were observed depending upon the stage of the disease. FACS analyses revealed two distinct populations of kidney MØs in our model, referred to as R1 (F4/80^{low}CD11b^{high}) and R2 (F4/80^{high}CD11b⁺). Two days after rhabdomyolysis, R1 were dominant. By day 8, we observed a shift whereby the R2 cells became the predominant MØ cell-type and also observed expression of CD206, a marker for tissue repair. Single-cell analyses revealed that the subpopulations were heterogeneous and that individual cells simultaneously expressed both M1 and M2 markers. Liposomal clodronate (LC)-mediated MØ depletion indicated that the early infiltration of R1 macrophages plays an important role in disease progression. Transcriptionally regulated targets, such as fibronectin, collagen III and chemo-attractants, that could participate in the disease progression, were identified via single-cell analysis and verified to be expressed in the kidney in a MØ-dependent manner *in situ*. Further, *in vitro* analyses showed that inflammatory processes were directly favoured by muscle-released myoglobin since it induced tubular cells to secrete chemo-attractants and MØs to express pro-inflammatory markers. At day 30, early CL-mediated MØ depletion improved kidney repair and mouse survival, suggesting that early intervention can also affect disease progression over the long term. Seven months after rhabdomyolysis, the observed fibrotic lesions were significantly reduced in the CL-treated group, suggesting that early MØ depletion limits rhabdomyolysis-induced injuries and advocating the utility of long-term follow-up for patients with rhabdomyolysis-induced AKI.

We also performed a short-term study to assess the interest of detecting endothelial inflammation during AKI and chronic kidney disease. VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) allows leukocyte and MØ recruitment in injured tissues and its expression can be measured *in vivo* via enhanced molecular imaging. This technology appears to be a relevant approach to monitor kidney inflammation in a powerful non-invasive manner.

Finally, this work emphasizes the need to consider inflammatory processes in kidney injuries, even in the case of non-immune diseases.

Sommaire

1. POURQUOI S'INTERESSER AUX PHENOMENES INFLAMMATOIRES DANS LES MALADIES RENALES ?-----	1
AVANT-PROPOS.....	1
1.1 AGRESSION RENALE AIGUË (ARA)	2
1.1.1 Définition	2
1.1.2 Sévérité	2
1.1.3 Epidémiologie.....	4
1.2 MALADIE RENALE CHRONIQUE (MRC).....	5
1.2.1 Définitions.....	5
1.2.2 Anomalies morphologiques tissulaires	5
1.2.3 Anomalies fonctionnelles.....	6
1.2.4 Epidémiologie.....	6
1.3 AGRESSION RENALE AIGUË ET MALADIE RENALE CHRONIQUE ENTRETIENNENT DES LIENS ETROITS	8
1.3.1 Le dogme de la récupération « <i>ad integrum</i> »	8
1.3.2 L'ARA, un facteur de risque pour la MRC	9
1.3.3 La MRC, un facteur de risque de survenue d'ARA.....	10
1.3.4 Le cercle auto-aggravant ARA-MRC	10
1.4 MECANISMES PHYSIOPATHOLOGIQUES DE LA PROGRESSION DE L'ARA EN MRC	12
1.4.1 Réduction néphronique et hypertrophie compensatrice.....	12
1.4.2 Défaut de réparation de l'épithélium tubulaire	12
1.4.3 Atteinte endothéliale et raréfaction vasculaire	13
1.4.4 Inflammation rénale : première phase de l'ARA vers la MRC	14
CONCLUSION	19
2. DONNEES FONDAMENTALES SUR LA POLARISATION DES MACROPHAGES -----	20
AVANT-PROPOS.....	20
2.1 DEFINITION	21
2.2 HISTORIQUE	21
2.3 SPECIALISATION DES MACROPHAGES SELON LEUR LOCALISATION ANATOMIQUE.....	21
2.4 CARACTERISATION DES MACROPHAGES.....	22
2.4.1 Ontogénie des macrophages	22
2.4.2 Identification des macrophages par leur phénotype de surface	25
2.4.3 Identification des macrophages par leur activité transcriptionnelle.....	27
2.4.4 Identification des macrophages par leur fonction biologique.....	32
CONCLUSION	34

3. POLARISATION DES MACROPHAGES DANS LE REIN -----35

AVANT-PROPOS.....	35
3.1 DONNEES SUR LES MACROPHAGES RENAUX EN CONDITION D'HOMEOSTASIE	36
3.1.1 Topographie dans le rein	36
3.1.2 Phénotype des sous-populations	37
3.2 DONNEES SUR LES MACROPHAGES RENAUX EN CONDITION D'AGRESSION.....	39
3.2.1 Les macrophages peuvent contribuer à aggraver la pathologie rénale.	39
3.2.2 Les Mø peuvent ralentir le cours évolutif de la pathologie rénale.	42
3.2.3 Que conclure du rôle des Mø dans les néphropathies ?	45
3.3 LA MANIPULATION DU MPS DANS LES NEPHROPATHIES : FUTUR OU REALITE ?.....	48
3.3.1 Les stratégies de déplétion : utiles pour la recherche fondamentale.....	48
3.3.2 Les transferts adoptifs : en développement	48
3.3.3 Les inhibiteurs de recrutement : en développement	49
3.3.4 L'utilisation du MPS comme vecteurs biologiques	49
CONCLUSION	50

4. LES MACROPHAGES RENAUX CONTRIBUENT-ILS A L'EVOLUTION DE LA TUBULOPATHIE POST-RHABDOMYOLYSE ? -----51

AVANT PROPOS	51
4.1 DEFINITION	52
4.2 HISTORIQUE	52
4.3 ETIOLOGIES DE LA RHABDOMYOLYSE	52
4.3.1 Traumatiques	52
4.3.2 Exercice musculaire intense	52
4.3.3 Vasculaires	52
4.3.4 Changements brutaux de température corporelle	53
4.3.5 Toxiques (médicamenteux ou non).....	53
4.3.6 Infections	53
4.3.7 Troubles métaboliques et hydro-électrolytiques	54
4.3.8 Myopathies métaboliques	54
4.4 EPIDEMIOLOGIE	55
4.5 PRONOSTIC VITAL A COURT TERME	55
4.6 PRONOSTIC RENAL A LONG TERME : L'INCONNU.....	56
4.7 PHYSIOPATHOLOGIE	58
4.7.1 Apport des modèles murins	58
4.7.2 Le <i>Primum movens</i> est la lésion musculaire	58
4.7.3 La lésion musculaire engendre des perturbations systémiques	59
4.7.4 Le rein se trouve en situation d'agression aiguë	59

4.8	PRISE EN CHARGE CLINIQUE ACTUELLE	64
4.9	STRATEGIES THERAPEUTIQUES EN DEVELOPPEMENT	65
4.9.1	Limiter le stress oxydant lié à la myoglobine	65
4.9.2	Protéger les cellules rénales	65
4.9.3	Administrer des agents réparateurs.....	65
4.10	L'IMPLICATION DU SYSTEME IMMUNITAIRE	66
4.10.1	Présence de macrophages sur des biopsies humaines	66
4.10.2	Données expérimentales sur l'infiltrat macrophagique rénal.....	67
4.10.3	Hypothèses sur la polarisation des macrophages dans la rhabdomyolyse.....	68
	CONCLUSION	71
5.	TRAVAIL PERSONNEL -----	72
5.1	INTRODUCTION	72
5.2	MANUSCRIT	74
6.	DISCUSSION & PERSPECTIVES-----	75
6.1	QUESTIONNEMENTS PHYSIOPATHOLOGIQUES	75
6.1.1	Ontogénie des R2 huit jours après la rhabdomyolyse	75
6.1.2	Effet différentiel du CL.....	77
6.1.3	Lien entre la lésion musculaire et l'ARA	78
6.1.4	Rôle de la myoglobine en tant qu'antigène	79
6.1.5	Les macrophages, cellules parmi tant d'autres	79
6.2	QUESTIONNEMENTS CLINIQUES.....	81
6.2.1	Pertinence du ratio M1/M2.....	81
6.2.2	Composante hypovolémique dans le modèle expérimental.....	81
6.2.3	La rhabdomyolyse à l'origine de lésions silencieuses de fibrose	84
6.3	QUESTIONNEMENTS THERAPEUTIQUES.....	86
6.3.1	Les bloqueurs du recrutement.....	86
6.3.2	Les corticoïdes	86
6.4	ANNEXES.....	87
7.	IMAGERIE D'UNE MOLECULE D'ADHESION ENDOTHELIALE IMPLIQUEE DANS LE RECRUTEMENT DES MACROPHAGES RENaux (NOTE TECHNIQUE)-----	92
	AVANT-PROPOS.....	92
7.1	POURQUOI APPLIQUER L'IMAGERIE MOLECULAIRE DE VCAM-1 AU REIN ?	93
7.1.1	Nécessité de nouvelles méthodes diagnostiques.....	93
7.1.2	Principe de l'imagerie moléculaire de VCAM-1.....	93
7.1.3	Données disponibles sur VCAM-1 dans le rein	95
7.1.4	Introduction au travail personnel.....	97

7.2	MANUSCRIT	98
7.3	DISCUSSION	99
	7.3.1 Limites de l'étude	99
	7.3.2 Intérêt clinique.....	99
7.4	CONCLUSION	100
8.	BIBLIOGRAPHIE -----	101

Table des illustrations

Figure 1 : Classifications de la sévérité de l'ARA selon RIFLE et AKIN.	2
Figure 2: Classification de l'ARA proposée par KDIGO en 2012.....	3
Figure 3: Augmentation de l'incidence de l'ARA aux Etats-Unis.	4
Figure 4: Fibrose tubulo-interstitielle.	5
Figure 5 : Classification de la MRC en 5 stades.	6
Figure 6: Causes d'insuffisance rénale terminale traitée.....	7
Figure 7 : Effet cumulatif des épisodes d'ARA sur la survenue d'une IRC.....	9
Figure 8 : ARA et MRC forment un duo menaçant.....	10
Figure 9 : Néphropathies dans lesquelles l'inflammation joue un rôle.	14
Figure 10 : Bases moléculaires de l'inflammation stérile.	16
Figure 11 : Fibrose rénale, importance du système immunitaire (en encadré rouge).	17
Figure 12: Mécanismes physiopathologiques à l'origine de la MRC après une ARA.....	18
Figure 13: Illustrations d'Elie Metchnikoff (1891, 1905).	21
Figure 14 : Hématopoïèse des précurseurs des macrophages.	22
Figure 15: Diapédèse des monocytes sanguins. D'après Cavailé, 2013.....	23
Figure 16 : Molécules impliquées dans le recrutement des monocytes.....	23
Figure 17: Marqueurs de surface cellulaire utilisés pour la caractérisation des macrophages.....	25
Figure 18: Voies de signalisation impliquées dans la polarisation des macrophages.	28
Figure 19 Différents sous-types de macrophages M2.	29
Figure 20 : Le spectre de l'activation des macrophages.	30
Figure 21 : Marqueurs macrophagiques spécifiques et communs aux espèces humaines et murines....	32
Figure 22: Déplétion du macrophage par le clodronate liposomal.	33
Figure 23 : Localisation des Mø dans le tissu rénal (flèches).	36
Figure 25 : Deux sous-populations majoritaires de macrophages sont retrouvées dans le rein normal.	38
Figure 26: L'infiltration du tissu rénal par les macrophages est un facteur de mauvais pronostic.	39
Figure 27 : Effets opposés de la déplétion des macrophages.....	45
Figure 28 : Polarisation bi-phasique des macrophages.....	46
Figure 29 : Liste des principaux toxiques responsables de rhabdomyolyse.....	53
Figure 30 : Score pronostique de la survenue d'une insuffisance rénale aiguë suite à une rhabdomyolyse.	55
Figure 31 : Evolution clinique des principaux paramètres biologiques lors d'une rhabdomyolyse.....	56
Figure 32 : Phénomènes initiaux lors d'une rhabdomyolyse.....	59
Figure 33 : Structure tridimensionnelle de la molécule de myoglobine.....	60
Figure 34: Néphrotoxicité de la myoglobine.	61
Figure 35: Dégradation de l'hème par l'enzyme Hème-oxygénase.....	62
Figure 36: Recommandations thérapeutiques pour la prise en charge d'une rhabdomyolyse.....	64
Figure 38: Expression de récepteurs captant l'hème à la surface des macrophages.....	68
Figure 39: Activation de l'inflammasome dans les cellules dendritiques par des cristaux intratubulaires.....	70
Figure 40 : Visualisation de MPIO-αVCAM-1 au contact d'une veinule en microscopie optique.	94
Figure 41 : Images de cerveau, en IRM après injection de MPIO-αVCAM-1.....	95
Figure 42 : Expression rénale de VCAM-1 après rhabdomyolyse.....	96
Figure 43 : Images des reins, en IRM après injection de MPIOαVCAM-1 en contexte d'ischémie-reperfusion.	96

Liste des abréviations

AKIN	acute kidney injury network
ANCA	anticorps anti-cytoplasme des polynucléaires neutrophiles
ARA	agression rénale aiguë
Ccl	CC-chemokine ligand
Ccr	CC-chemokine receptor type 2
CD	cluster de différenciation
CK	créatine kinase
CO	monoxyde de carbone
CSF-1	colony-stimulating factor 1
DAMPS	damage-associated molecular patterns
DC	cellules dendritiques
DFG	débit de filtration glomérulaire
EGF	epidermal growth factor
EPO	érythropoïétine
GEM	glomérulonéphrite extra-membraneuse
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony stimulating factor
GN	glomérulonéphrite
HGF	hépatocyte growth factor
HO	hème-oxygénase
HSF	hyalinose segmentaire et focale
HSP	heat shock protein
I/R	ischémie-reperfusion
IGF-1	insulin-like growth factor-1
IRA	insuffisance rénale aiguë
IRC	insuffisance rénale chronique
IRTT	insuffisance rénale terminale traitée
LGM	lésions glomérulaires minimales
M-CSF	macrophage colony-stimulating factor
MAT	micro-angiopathie thrombotique
MBG	membrane basale glomérulaire
MDRD	modification of diet in renal disease
MEC	matrice extra-cellulaire
MMP	métalloprotéinase matricielle
Mø	macrophage
MPS	mononuclear phagocyte system
MRC	maladie rénale chronique
MSC	cellules souches mésenchymateuses
NET	neutrophile extracellular traps
NLRP3	NLR family, pyrin domain containing 3
OUU	obstruction urétérale unilatérale
PAMPS	pathogenes-associated molecular patterns
PMH	par million d'habitants
PRR	pattern recognition receptors
RIFLE	Risk, Injury, Failure, Loss, ESKD
TGF	transforming growth factor
TLR	toll-like Receptors
TNF	tumor necrosis factor
Treg	T régulateur
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule-1

1. Pourquoi s'intéresser aux phénomènes inflammatoires dans les maladies rénales ?

Avant-propos

La principale fonction du rein consiste à élaborer l'urine qui élimine plusieurs déchets. Cette fonction primordiale de filtration est dénommée « fonction rénale » dans le langage courant, bien que ce raccourci excessif passe sous silence d'autres rôles du rein tout aussi importants comme le maintien de la pression artérielle ou l'élaboration d'hormones (érythropoïétine (EPO), vitamine D active, rénine). Les néphrologues ont classé la diminution de la fonction rénale selon deux syndromes distincts, l'insuffisance rénale aiguë (IRA) et l'insuffisance rénale chronique (IRC). Alors que l'IRC était bien identifiée depuis le 19^{ème} siècle, l'IRA a émergé il y a une centaine d'années. Une cause singulière d'IRA a été reconnue au cours des bombardements en Angleterre dans les années 1940 et caractérisée comme secondaire à une rhabdomyolyse traumatique (*crush-injury*). En cas de défaillance sévère, l'IRA comme l'IRC peuvent nécessiter un recours à un traitement de suppléance (épuration extra-rénale par dialyse péritonéale ou hémodialyse, ou transplantation rénale). Ces traitements représentent un enjeu majeur en matière de santé publique (2% du budget de santé en France), de thérapeutique, et de connaissances scientifiques fondamentales. IRA et IRC ont longtemps été considérés comme deux entités totalement disjointes, avec leurs lots de causes et pronostics distincts. Deux concepts ont récemment modifié ce paysage simpliste opposant maladies rénales aiguës et chroniques :

- **L'IRA et l'IRC ne représentent pas des entités cliniques distinctes mais entretiennent d'étroites connexions.** Epidémiologie humaine et modèles expérimentaux ont apporté de nombreux arguments, qui proposent l'IRA en tant que facteur de risque de développer l'IRC, l'IRC en tant que facteur de risque de développer l'IRA, IRA et IRC tous deux assimilés à des facteurs de risque de maladie cardio-vasculaire.
- **L'IRA constitue une situation d'inflammation stérile.** Les phénomènes immunologiques, jusqu'à présent indissociables de la présence de pathogènes, y sont prépondérants et reconnus comme fondamentaux dans l'agression puis la réparation tissulaire. Une inflammation persistante dans le cadre d'une IRA promeut une réparation aberrante, cicatricielle, dont le mode tardif d'expression est une IRC.

Le chapitre présent expose les arguments justifiant l'intérêt que l'on doit porter à la phase inflammatoire des maladies rénales.

1.1 Agression rénale aiguë (ARA)

1.1.1 Définition

L'ARA désigne un syndrome clinique caractérisé par :

- une diminution rapide de la fonction excrétrice du rein (sur une période allant de quelques heures à quelques jours)
- l'accumulation de produits dérivés du métabolisme de l'azote tels que la créatinine, l'urée et d'autres toxines non mesurées en routine.

D'autres manifestations clinico-biologiques coexistent le plus souvent, telles qu'une diminution de la diurèse, et l'augmentation des taux de potassium, phosphore, acides plasmatiques. Le terme d'« agression » remplace désormais le terme d'« insuffisance », pour souligner que l'agression rénale précède la détection de la perte de fonction identifiée par les tests de routine au laboratoire. Même avec un taux de créatininémie normal, avant le stade d'IRA, un patient en situation d'ARA est déjà exposé à un sur-risque de mortalité.

1.1.2 Sévérité

De nombreuses classifications de l'ARA, complexes et disparates, ont été proposées. On retiendra surtout la classification s'appuyant sur l'acronyme anglo-saxon *RIFLE*, parue en 2004[1], qui repose sur des variations de la créatininémie (S_{creat}) ou du débit de filtration glomérulaire (DFG) et/ou de la diurèse, modifiée en 2007 sous le terme d'*AKIN* pour *Acute Kidney Injury Network* [2].

RIFLE		AKIN		AKIN & RIFLE
Classe	S_{creat} ou DFG	Stade	S_{creat}	Diurèse
« Risk »	Augmentation S_{creat} 1,5 fois Ou diminution du DFG >25%	1	Augmentation $\geq 26,5 \mu\text{mol/L}$ Ou augmentation 1,5 – 2 fois par rapport à la référence	< 0,5mL/kg/h durant 6h
« Injury »	Augmentation S_{creat} 2 fois Ou diminution du DFG >50%	2	Augmentation 2 – 3 fois par rapport à la référence	< 0,5mL/kg/h durant 12h
« Failure »	Augmentation S_{creat} 3 fois Ou diminution du DFG >75% Ou $S_{\text{creat}} \geq 350 \mu\text{mol/L}$ Ou augmentation brutale $S_{\text{creat}} > 40 \mu\text{mol/L}$	3	Augmentation > 3 fois par rapport à la référence Ou augmentation $\geq 354 \mu\text{mol/L}$ avec une hausse > 44 $\mu\text{mol/L}$ Ou recours à l'épuration extra-rénale	< 0,3mL/kg/h durant 24h Ou anurie durant 12h
« Loss »	Perte de fonction rénale > 4 semaines			
« ESKD »	Maladie rénale terminale > 3 mois			

Figure 1 : Classifications de la sévérité de l'ARA selon RIFLE et AKIN.

DFG : débit de filtration glomérulaire, S_{creat} : créatininémie, ESKD : end-stage kidney disease.

Le score *RIFLE* a permis de mesurer la sévérité de l'ARA et de prédire le pronostic du patient. Malheureusement plusieurs limites sont apparues :

- la difficulté d'identifier la valeur de S_{creat} de référence pour certains patients, qui n'ont jamais bénéficié de dosage précédant l'épisode d'ARA
- la proposition par défaut d'une valeur de base à 75 mL/min/1,73m² selon la formule *Modification of Diet in Renal Disease* (MDRD), proposition potentiellement erronée pour les patients en IRC, ou en situation d'ARA
- le manque de sensibilité si le critère de diurèse est absent
- les biais influençant la diurèse (diurétiques, nécessité de cathétérisme vésical)
- l'absence de considération de l'étiologie de l'ARA : pré-rénale (hypoperfusion), post-rénale (obstruction des voies urinaires) ou rénale (maladie vasculaire, glomérulonéphrite (GN), néphrite interstitielle aiguë et nécrose tubulaire aiguë)
- la méconnaissance du recours à une épuration extra-rénale.

La classification d'*AKIN* a permis d'ajouter les modifications suivantes :

- le diagnostic d'ARA n'est fait qu'après obtention d'un état d'hydratation adéquat, et après exclusion des causes obstructives
- seule la valeur de S_{creat} (non plus DFG) est considérée
- le recours à deux valeurs de S_{creat} obtenues dans un intervalle de 48 heures est possible, sans nécessairement avoir de valeur basale chez le patient.

Plusieurs études ont comparé les deux classifications. Au final, les critères *RIFLE* ne détectent pas 9% des cas détectés avec *AKIN*, et les critères *AKIN* passent sous silence 26,9% des cas détectés par *RIFLE*. La recommandation actuelle, émise par le groupe de travail international KDIGO (*Kidney Disease Improving Global Outcomes*) en 2012, propose une combinaison des deux scores, plus claire[3].

Stade	S_{creat}	Diurèse
1	1,5 – 1,9 fois par rapport à la référence en 7 jours Ou Augmentation de $\geq 26,5 \mu\text{mol/L}$ en 48h	$< 0,5\text{mL/kg/h}$ durant 6-12h
2	2 – 2,9 fois par rapport à la référence	$< 0,5\text{mL/kg/h}$ durant plus de 12h
3	3 fois par rapport à la référence Ou Valeur $\geq 354 \mu\text{mol/L}$ Ou Recours à l'épuration extra-rénale Ou Chez les patients < 18 ans, diminution DFG $< 35 \text{ mL/min/1,73m}^2$	$< 0,3\text{mL/kg/h}$ durant plus de 24h Ou Anurie durant plus de 12h

Figure 2: Classification de l'ARA proposée par KDIGO en 2012.

1.1.3 Epidémiologie

La prévalence de l'ARA est estimée entre 1 et 26% selon les sources et les définitions[4]. L'incidence rapportée de l'ARA varie de 5% pour l'ensemble des patients hospitalisés, à 30-50% dans les unités de soins intensifs. L'incidence de l'ARA dans la population générale hospitalisée est croissante (11% par an[5]), sans que les raisons en soient clairement identifiées. Une étude publiée en 2013 sur la population nord-américaine rapporte une augmentation de l'incidence de l'ARA nécessitant le recours à la dialyse (figure 3). Entre 2000 et 2009, le nombre de cas est passé de 63 000 en 2000 à 164 000 en 2009[6].

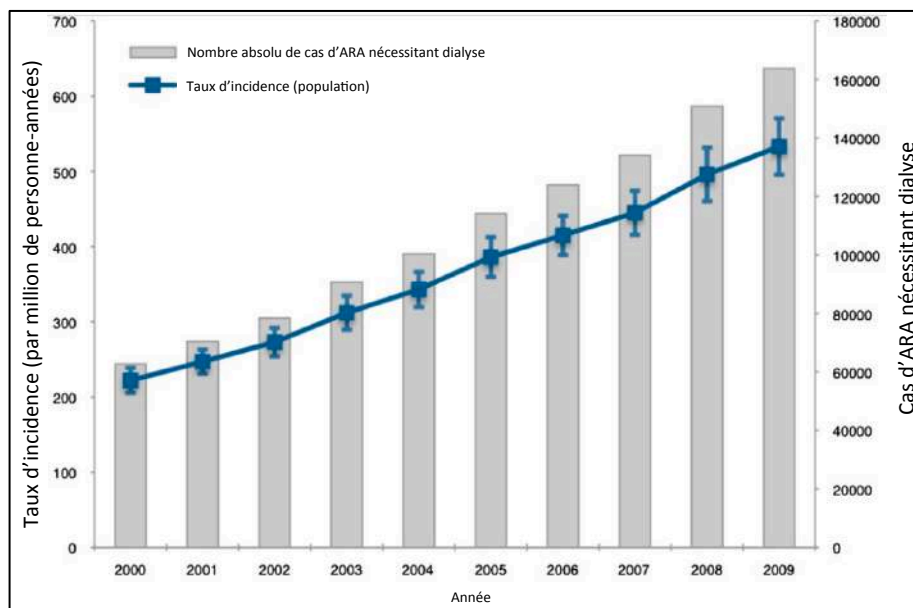


Figure 3: Augmentation de l'incidence de l'ARA aux Etats-Unis.

D'après [6]

L'ARA est responsable de 2 millions de décès chaque année dans le monde [7]. Une ARA nécessitant le recours à une épuration extra-rénale s'accompagne d'une mortalité d'environ 60% [7]. Parmi les facteurs de risque identifiés, on retiendra l'âge, le diabète, l'ethnie afro-américaine et la préexistence d'une IRC (qui multiplie par 10 le risque).

1.2 Maladie rénale chronique (MRC)

1.2.1 Définitions

La MRC se définit par la présence d'anomalies morphologiques ou fonctionnelles du rein persistant plus de 3 mois. L'IRC désigne une diminution du DFG.

1.2.2 Anomalies morphologiques tissulaires

La « fibrose rénale » est un terme anatomo-pathologique, désignant une forme aberrante de réparation, succédant à une agression rénale. Les lésions histologiques de fibrose sont non spécifiques. Elles s'ajoutent aux lésions spécifiques de la néphropathie causale, et associent : destruction de l'architecture rénale, raréfaction cellulaire, et surtout augmentation des dépôts de matrice extracellulaire (MEC). La fibrose résulte d'un processus complexe, et peut concerner les vaisseaux, les glomérules ou le secteur tubulo-interstitiel. Le caractère stéréotypé des lésions fibrotiques, quelle que soit la néphropathie initiale, plaide en faveur d'un processus final commun. On décrit schématiquement la fibrogénèse en trois phases : inflammation, enrichissement en cellules sécrétant la MEC, et accumulation de la MEC. L'étendue de la fibrose tubulo-interstitielle est prédictive de la défaillance rénale, et revêt une valeur pronostique. Ci-dessous la figure 4 illustre la MRC sur le versant tissulaire.

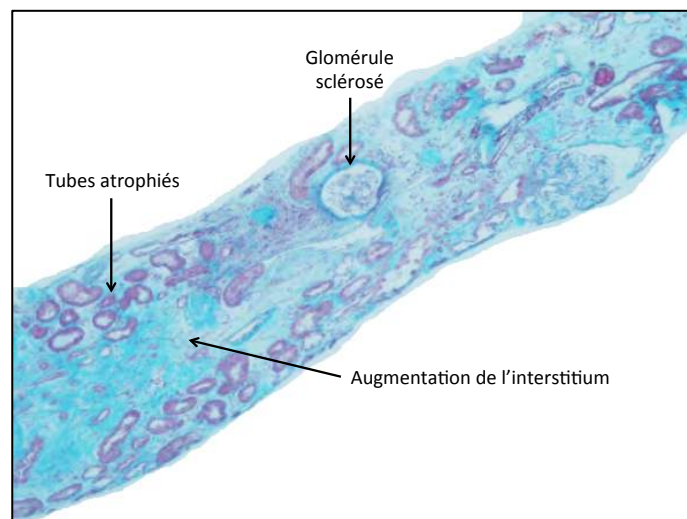


Figure 4: Fibrose tubulo-interstitielle.

Biopsie rénale humaine, coloration de Masson, d'après Laure-Hélène Noël.

1.2.3 Anomalies fonctionnelles

Si les lésions structurales sont trop étendues, la fonction globale de l'organe s'en trouve affectée, et une insuffisance apparaît. La MRC se classe en 5 stades selon la sévérité de l'IRC (figure 5). Un traitement de suppléance est généralement instauré au stade 5.

Stade	Définition	DFG (mL/min/1,73m ²)
1	Marqueurs d'atteinte rénale avec DFG normal ou augmenté	≥90
2	Marqueurs d'atteinte rénale avec DFG légèrement diminué	60-89
3A	IRC modérée	45-59
3B	IRC modérée	30-44
4	IRC sévère	15-29
5	IRC terminale	<15

Figure 5 : Classification de la MRC en 5 stades.

D'après National Kidney Foundation Kidney Disease Outcomes Quality Initiative. Marqueurs d'atteinte rénale: élévation du ratio albumine/créatinine urinaire.

1.2.4 Epidémiologie

Pour les stades 1 à 4, les données de prévalence proviennent essentiellement des Etats-Unis. Les chiffres sont alarmants : 11,7% d'IRC aux stades 1-4, et 3,8% pour les seuls stades 3-4 (15 à 59 mL/min/1,73m²) en 1999-2000, soit un rapport de l'ordre de 1 à 100 par rapport au stade 5 traité [8]. En Europe, une étude norvégienne rapporte une prévalence voisine estimée à 10,2%, avec 4,4% de patients au stade 3-4 en 1995-1997[9]. Alors que les prévalences sont comparables entre les Etats-Unis et la Norvège, l'incidence est 3 fois plus élevée aux Etats-Unis qu'en Norvège : 339 *versus* 96 par million d'habitants (pmh) en 2004. Comme le soulignait l'épidémiologiste B. Stengel [10], cette discordance laisse perplexe et montre qu'il reste beaucoup à faire pour comprendre l'histoire naturelle de l'IRC.

En France, les données précises concernent essentiellement la fraction de patients parvenus au **stade 5** d'insuffisance rénale terminale, et traités par traitement de suppléance. Elles proviennent du registre REIN (Réseau Epidémiologie Information Néphrologie)[11]. D'après le dernier rapport publié, au 31 décembre 2012, on dénombrait en France 73 491 personnes en traitement de suppléance rénale dont 40 983 (56 %) en dialyse et 32 508 (44 %) porteuses d'un greffon rénal fonctionnel. La prévalence brute globale de l'IRT (insuffisance rénale terminale traitée) est de 1 127 pmh. Elle est 1,6 fois plus élevée chez les hommes que chez les femmes. Si l'IRT touche toutes les tranches d'âge, les personnes âgées constituent la majorité des patients incidents (âge médian au début du traitement : 70,7 ans). En 2012, en France, 9 710 personnes ont commencé une dialyse (incidence de la dialyse : 149 pmh) et 338

personnes ont reçu pour la première fois une greffe rénale sans avoir été dialysées auparavant (incidence de la greffe préemptive : 5 pmh), soit une incidence globale de recours à un traitement de suppléance rénale de 154 pmh. Les causes d'IRT^T sont répertoriées dans la figure 6 et se répartissent de la manière suivante :

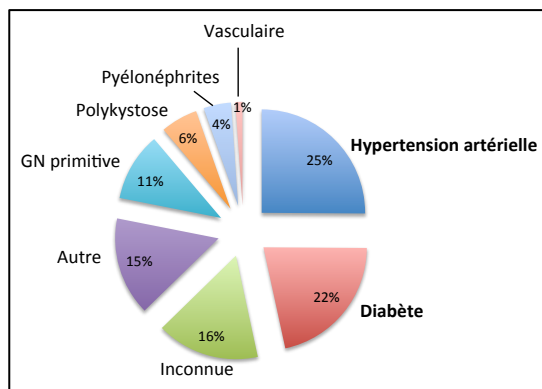


Figure 6: Causes d'insuffisance rénale terminale traitée

Incidence 2012 par néphropathie initiale (par million d'habitants), d'après le registre REIN 2012.

Les maladies rénales ont un impact tout d'abord pour la société en terme économique (une année de dialyse ayant un coût estimé à 90 000 euros), mais aussi pour les individus dans la mesure où les soins sont fréquents et impactent sur la qualité de vie.

1.3 Agression rénale aiguë et maladie rénale chronique entretiennent des liens étroits

Si la distinction entre IRA et MRC est consensuelle, il faut souligner qu'IRA et MRC peuvent faire partie d'un continuum.

1.3.1 Le dogme de la récupération « *ad integrum* »

Un patient ayant survécu à un épisode d'ARA est souvent considéré comme ayant complètement guéri. Très peu de données sont disponibles sur le devenir clinique à long terme après une ARA, en raison de plusieurs facteurs qui s'additionnent.

1.3.1.1 Patients perdus de vue

Suivre une cohorte de patients ayant présenté un épisode d'ARA est difficile, dès que l'on s'attache à avoir un effectif puissant ou un recul suffisant. En dehors d'un suivi planifié dans le cadre d'une enquête clinique, les patients ayant récupéré après une ARA sont rarement revus par le néphrologue, sauf en cas de récurrence ou de complication intercurrente. L'absence de signes cliniques (notamment la douleur), un suivi médical irrégulier, ainsi que la nécessité de recourir à une analyse biologique pour diagnostiquer l'ARA peuvent contribuer à des retards ou méconnaissances diagnostiques.

1.3.1.2 Limites des outils de mesure de la fonction rénale

Statuer sur la récupération de la fonction à l'aide du retour de la créatininémie dans les valeurs de référence est délicat et s'avère parfois insuffisant. Evaluer la fonction rénale par la seule S_{creat} a des limites : variation de la production endogène de créatinine, sécrétion tubulaire non négligeable, interférences médicamenteuses, détection de faux-positifs. La créatininémie est un marqueur de la fonction rénale, mais pas de la lésion rénale. Les formules d'estimation du DFG, qui ne seront pas abordées ici, ont également leur limite. La détection d'un statut fonctionnel imparfait à distance d'une ARA nécessiterait la réalisation d'une mesure du DFG par une méthode de référence (par exemple la clairance de l'inuline), pratique non systématique après une ARA.

1.3.1.3 Interprétation des données épidémiologiques

Le pronostic global de l'ARA en matière de morbi-mortalité est très étudié, mais les travaux publiés regroupent parfois des définitions et des étiologies de l'ARA qui sont très différentes. Un travail réalisé sur 187 patients suivis pendant 10 ans rapporte un retour à une fonction rénale normale dans 81% des cas. Les 19% restant ont un moins bon pronostic, fait attribué à leurs co-morbidités, la cause de l'ARA et l'âge avancé[12]. L'homogénéité de la cohorte étudiée est primordiale. La récupération après un

épisode d'ARA dépend étroitement de la réserve fonctionnelle de l'organe rénal, qui est plus grande chez un patient jeune, sans facteurs de risque, que chez un patient âgé, où des mécanismes lésionnels liés au vieillissement interviennent.

1.3.2 L'ARA, un facteur de risque pour la MRC

Le fait que les patients puissent ne pas recouvrir leur fonction rénale pré-ARA a été suggéré par plusieurs observations concordantes. Un exemple fort est l'association entre la survenue d'une pré-éclampsie (pathologie de la grossesse caractérisée par une élévation de la pression artérielle et une atteinte rénale vasculaire) et le développement ultérieur d'une MRC (dont le risque relatif atteint 4,7 dans cette étude réalisée sur 477 patientes [13]). Deux récentes revues générales documentent le risque de MRC, qui est de 3 à 40 fois plus élevé chez des patients ayant présenté un épisode d'ARA, par comparaison à des individus indemnes d'ARA [14, 15].

Un épisode d'ARA peut impacter sur la survenue d'une MRC par son intensité initiale (le niveau de créatininémie, un score de *RIFLE* élevé étant associé à un risque accru d'évolution vers la chronicité) et par son nombre d'occurrence (la répétition des ARA augmentant le risque de MRC). La durée de l'ARA ne semble pas jouer sur la survenue de la MRC, mais plutôt sur la mortalité globale. Dans la figure 7 ci-dessous, la courbe de survie illustre l'effet délétère additif d'ARA répétées (survie avec un DFG >29mL/min/1,73m² dans une cohorte de 4000 diabétiques) [16].

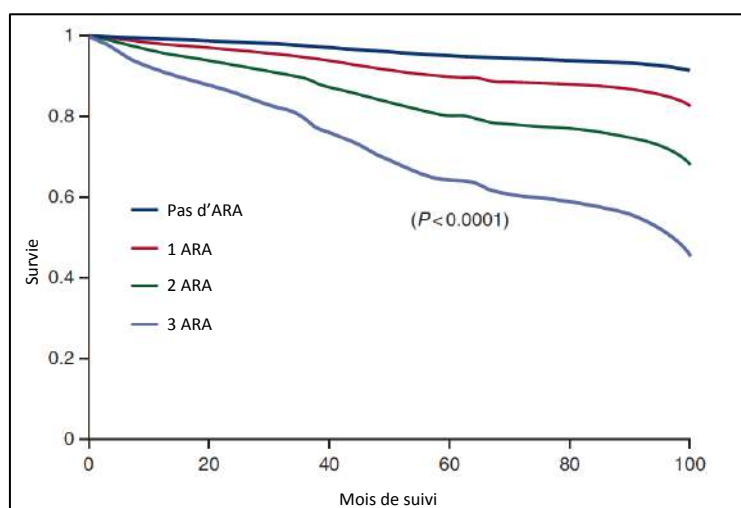


Figure 7 : Effet cumulatif des épisodes d'ARA sur la survenue d'une IRC.

D'après[16]

1.3.3 La MRC, un facteur de risque de survenue d'ARA

Les patients en situation de MRC présentent de manière constitutionnelle une fragilité multifactorielle qui augmente leur sensibilité à l'ARA: instabilité hémodynamique par défaut d'autorégulation, susceptibilité accrue aux agents néphrotoxiques, phénomènes humoraux. Ainsi les patients porteurs de MRC présentent-ils 8,4 fois plus de risque de progresser vers l'IRT par comparaison aux patients indemnes de MRC. Ce risque passe à 41 si les patients en MRC sont victimes d'un épisode d'ARA dans leur histoire [17]. Des constatations similaires sont retrouvées en milieu pédiatrique, où la MRC a été rapportée suite à une ARA en l'absence de facteurs confondants (ni hypertension, ni diabète, ni maladie vasculaire). Ceci suggère donc que l'ARA déclenche des processus participant à l'installation de la MRC[14].

1.3.4 Le cercle auto-aggravant ARA-MRC

Ces données indiquent qu'ARA et MRC sont pour partie reliées : ces deux situations partagent des facteurs de risque et des déterminants (figure 8). Quand une ARA survient, elle expose le patient à des séquelles et au développement d'une MRC. La présence d'une MRC est une prédisposition à développer des épisodes d'ARA. ARA, MRC, et/ou la combinaison des deux sont associés à un sur-risque de morbi-mortalité, et à une réduction de la qualité de vie.

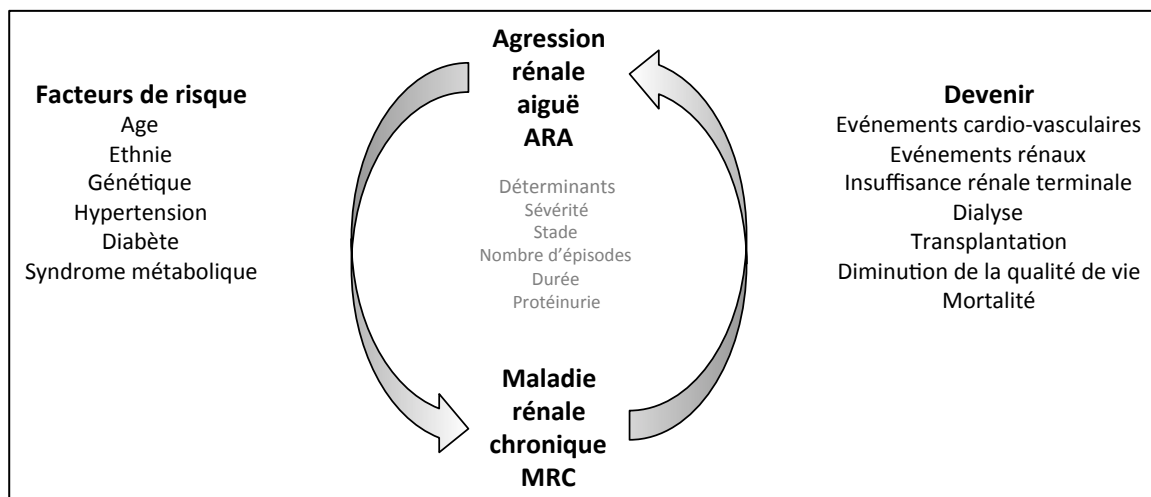


Figure 8 : ARA et MRC forment un duo menaçant.

D'après [14]

Les enjeux médico-scientifiques en néphrologie à l'heure actuelle sont donc doubles :

- Améliorer le pronostic de l'ARA. Les facteurs testés tels le peptide natriurétique atrial (ANP) [18], l'*insulin-like growth factor-1* (IGF-1) [19], l'EPO [20] n'ont pas eu le succès escompté. D'autres stratégies reposent sur la thérapie cellulaire. Chez la souris, certains auteurs ont émis l'hypothèse que les cellules souches hématopoïétiques pouvaient se différencier en cellules tubulaires [21], mais la contribution de ce type de phénomène à la réparation rénale reste à démontrer. Chez l'homme, dans une étude de phase I (NCT00733876), des patients à haut risque d'ARA après chirurgie cardiaque ont reçu des cellules souches mésenchymateuses (MSC) allogéniques, pour leur potentiel réparateur [22] et n'ont pas présenté d'effets indésirables. Malheureusement la faisabilité de ces approches et leur généralisation ultérieure restent à démontrer.
- Ralentir la progression de la MRC. Cet objectif semble possible à atteindre dans la mesure où des faits cliniques et expérimentaux indiquent que la fibrose rénale, si elle est détectée précocement, possède une certaine réversibilité. On a noté la régression des lésions de glomérulosclérose diabétique chez les patients diabétiques de type 1 bénéficiant d'une greffe pancréatique [23]. L'utilisation chronique d'inhibiteurs du système rénine-angiotensine-aldostérone favorise la régression des lésions, voire la régénération d'un tissu rénal normal (données chez l'homme et le rat [24, 25]).

Afin de pouvoir développer des stratégies visant à réduire les conséquences de la maladie rénale au sens large, il apparaît indispensable de compléter l'épidémiologie par des données mécanistiques et physiopathologiques.

1.4 Mécanismes physiopathologiques de la progression de l'ARA en MRC

Un point important est que la progression de la MRC peut être indépendante des facteurs qui l'ont causée. Par exemple, des patients qui développent une GN après une infection bactérienne par le streptocoque peuvent présenter des « séquelles » rénales comme une protéinurie, une hypertension, et ceci à distance de l'épisode, alors que le germe a disparu. Plusieurs hypothèses sont envisagées pour expliquer le développement de lésions fibrotiques après une ARA [15]:

1.4.1 Réduction néphronique et hypertrophie compensatrice

Dans une situation d'ARA, la masse rénale fonctionnelle se trouve réduite de manière brutale. Les néphrons restants (le néphron désignant l'unité fonctionnelle du rein, composée d'un glomérule et d'un tubule) doivent faire face à une charge de travail plus importante. Le DFG par néphron augmente, entraîne une hypertrophie, une prolifération cellulaire excessive et des dégâts tissulaires dus à de la fibrose ou de la sénescence, qui conduisent à la dégradation progressive des néphrons restants. Ces phénomènes ont été particulièrement décrits dans le modèle murin de néphrectomie sub-totale, dans lequel on retire chirurgicalement à l'animal 5/6^{ème} de son parenchyme rénal. Une ARA, en détruisant une certaine proportion de néphrons, peut conduire à l'hyper-sollicitation des néphrons résiduels et leur dysfonction à long terme, sous la forme d'une MRC.

1.4.2 Défaut de réparation de l'épithélium tubulaire

La réparation épithéliale est un processus complexe requérant la différenciation, la migration, la prolifération des cellules tubulaires survivantes. On estime classiquement qu'un délai de trois semaines est nécessaire. A ce jour, on ignore si les cellules tubulaires ont toutes la possibilité de régénérer le tubule ou s'il existe des unités de « cellules souches » endogènes. L'administration de facteurs de croissance - tels *epidermal growth factor* (EGF), *hepatocyte growth factor* (HGF), l'IGF-1- accélère la réparation tubulaire, et l'on peut voir augmenter l'expression de ces facteurs au cours d'une ARA [26, 27]. La régénération d'un épithélium intègre nécessite une coordination parfaite dans le temps et dans l'espace. De manière très intéressante, il a été évoqué qu'une « **mémoire biologique** » du rein pouvait exister après une ARA, et conférer ainsi aux cellules tubulaires une résistance acquise à des agressions ultérieures répétées. Des études historiques *in vitro* ont établi la possibilité de cytorésistance au nitrate d'uranyl, utilisé comme un inducteur d'ARA[28]. De même, la pratique d'une ischémie-reperfusion (I/R), suivie 24 à 48h après d'une seconde I/R, ne s'accompagne d'aucune aggravation des lésions initiales, tant sur le plan structurel que fonctionnel[29]. Les tubules rénaux, isolés après la seconde I/R, semblent résistants aux dommages hypoxiques [30]. Ces résultats, très encourageants, indiquent qu'un « pré-conditionnement ischémique » puisse avoir de bons résultats, en particulier dans la situation

classique de la transplantation. Parallèlement, l'ARA déclenche des réponses cytoprotectrices au sein du tubule rénal : la production de protéines de la famille des « heat shock protein » (HSPs), l'hème-oxygénase (HO) et le phénomène d'« **l'hépatisation rénale** ». Les cellules tubulaires en condition d'ARA produisent 4 protéines, normalement exclusivement synthétisées dans le foie, dont les propriétés seraient protectrices: (i) l'albumine (qui, en liant les acides gras, limiterait la toxicité membranaire et mitochondriale), (ii) l' α -foeto protéine (molécule immuno-modulatrice), (iii-iv) l'haptoglobine et l'hémopexine (propriétés anti-oxydantes). On retrouve dans les urines en situation d'ARA de l'ordre de 50 fois plus d' α -foeto protéine et d'haptoglobine [31].

Malheureusement, même s'ils sont décrits, ces phénomènes protecteurs semblent insuffisants pour prévenir la survenue d'une MRC, situation dans laquelle d'autres processus délétères deviennent majoritaires. Toute anomalie dans le cycle cellulaire des tubulocytes peut conduire à une réparation inadaptée. Par exemple, il a été montré que les cellules épithéliales agressées pouvaient s'arrêter en phase G2/M et activer la voie *c-jun NH(2)-terminal kinase*, qui déclenche la production de cytokines pro-fibrotiques (principalement le *transforming growth factor* TGF- β). Les tubulocytes acquièrent alors un phénotype qui favorise la croissance et l'activation de fibroblastes, sécrétant de la matrice en excès. Une fois activés, les fibroblastes parviennent difficilement à retrouver à leur état initial, en raison de modifications épigénétiques [32].

1.4.3 Atteinte endothéliale et raréfaction vasculaire

Si la réparation tubulaire après ARA est possible, la réparation endothéliale quant à elle est soumise à plus d'incertitudes. Plusieurs modèles expérimentaux d'ARA (I/R, obstruction urétérale unilatérale (OUU)) montrent une raréfaction vasculaire secondaire, allant de 30 à 50% selon les études[15]. La perte de la réserve vasculaire est une composante clé de l'installation de la fibrose, puisque le tissu devient hypoxique. Des réponses pro-inflammatoires et pro-fibrosantes auto-entretenues sont alors mises en jeu.

1.4.4 Inflammation rénale : première phase de l'ARA vers la MRC

1.4.4.1 Définition

L'« inflammation » est le terme désignant la réponse d'un tissu vivant, vascularisé, à une agression. Ces manifestations ont été décrites il y a 2 000 ans par Celsus : *rubor* (rougeur), *calor* (chaleur), *tumor* (gonflement), *dolor* (douleur). L'exemple de l'inflammation est la blessure cutanée, qui cicatrise grâce à la mise en jeu du système immunitaire, capital pour effectuer la détersion de la peau lésée et prévenir une surinfection du site. L'inflammation est donc nécessaire à la cicatrisation. Cependant, si l'inflammation se prolonge inutilement ou n'est pas résolue, une cicatrice anormalement fibrotique peut apparaître. Il existe donc des liens étroits entre inflammation et fibrose. Rudolf Virchow a ajouté à la séquence de Celsus la notion d'« impotence fonctionnelle ». En effet, si les cicatrices sont dominantes, et la réparation inappropriée, l'organe peut s'en trouver affecté dans son fonctionnement. En ce qui concerne le rein, une hypothèse serait que l'ARA déclenche une inflammation, qui, non ou mal résolue, peut donner lieu à la fibrose et la MRC.

1.4.4.2 L'inflammation : septique ou stérile ?

Parmi les néphropathies, certaines sont directement causées par une réponse immunologique dirigée contre des pathogènes, ou le soi (auto-immunité) et d'autres se compliquent d'une réponse immunologique secondaire.

Initiation et médiation par une réponse immunologique <ul style="list-style-type: none">▪ Infections rénales avec pathogènes: E.Coli, Hantavirus, BK virus, Leptospirose, Tuberculose, VIH▪ Infections extra-rénales compliquées d'atteinte rénale: choc septique, GN à complexes immuns post-infectieuse (endocardite, hépatites virales)▪ Auto-immunité systémique avec atteinte rénale: Néphropathie à IgA, Lupus, Sjögren, vascularites associées aux ANCA, syndrome hémolytique et urémique, GEM secondaire▪ Auto-immunité contre des antigènes exprimés par le rein: maladie des anticorps anti-membrane basale glomérulaire, GEM primitive, rejet d'allogreffe▪ Désordres systémiques: GN à dépôt de C3, syndrome hémolytique urémique atypique, LGM, sarcoïdose
Déclenchement d'une réponse immunologique secondaire <ul style="list-style-type: none">• Auto-immunité systémique s'accompagnant de phénomènes vasculaires et ischémiques, à savoir crise rénale sclérodermique, panartérite noueuse, vascularite à cellules géantes ou syndrome des anticorps anti-phospholipides• Tout désordre systémique: HSF primitive et secondaire, tubulopathies héréditaires, maladies kystiques, atteintes toxiques médicamenteuses ou liées aux agents de contraste, néphropathies liées aux cristaux et para-protéines,• Atteinte hémodynamique: athérosclérose, sténose micro- ou macro-vasculaire, choc, syndrome hépato-rénal, MAT, éclampsie, HSF de réduction néphronique• Néphropathie obstructive ou amylose

Figure 9 : Néphropathies dans lesquelles l'inflammation joue un rôle.

D'après [33].

Ainsi la majorité des néphropathies est-elle initiée ou entretenue par une inflammation dite « stérile » quand des agressions initiales non immunologiques (toxiques, métaboliques, chimiques, ischémiques, mécaniques) génèrent des signaux immunologiques. L'implication du système immunitaire sera décrite dans les paragraphes suivants, successivement dans l'ARA puis la MRC.

1.4.4.3 Phénomènes inflammatoires précoces dans l'ARA

L'ARA peut déclencher une réponse inflammatoire au travers de molécules nommées DAMPS pour *damage-associated molecular patterns* à l'instar des PAMPs *pathogenes-associated molecular patterns*. Les DAMPS sont reconnus par des récepteurs nommés PRR pour *pattern recognition receptors*. Les PRR regroupent 5 types de récepteurs : Toll-like Receptors (TLRs), NOD-like Receptors (NLRs), RIG-I-like receptors (RLRs), C-type lectin receptors CLR et absence in melanoma 2 (AIM2)-like Receptors. L'activation de PRRs par leurs ligands conduit à l'activation des inflammasomes, adaptateurs moléculaires dont la fonction finale est la production de la cytokine pro-inflammatoire IL-1 β .

1.4.4.3.1 DAMPS, signaux de l'ARA

1.4.4.3.1.1 DAMPS générés par mort cellulaire des tubulocytes.

Par opposition à l'apoptose (silencieuse sur le plan immunologique), la nécrose conduit à la libération de composants cellulaires dans le milieu extra-cellulaire. Habituellement confinés dans la cellule, ces DAMPS sont alors reconnus comme exogènes par les cellules immunes. Plusieurs voies de nécroses ont été identifiées (nécroptose, nécrose liée à l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondrial, ferroptose, pyroptose, NETose). Toutes peuvent générer des DAMPS dont l'immunogénicité est variable. Les DAMPS cellulaires les plus étudiés sont les molécules en provenance : (i) du noyau e.g. une injection d'histones dans la circulation rénale reproduit les lésions observées dans l'IRA via l'activation de TLR2 et TLR4[34]; (ii) de la mitochondrie e.g. l'ATP extra-cellulaire, en se liant au récepteur membranaire purinergique P2X7R, provoque un efflux de calcium activant l'inflammasome[35]. Le rôle délétère de P2X7R a été mis en évidence dans la fibrose rénale induite par l'OUU [36] ; (iii) du cytosol e.g. l'acide urique a été identifié comme activateur de l'inflammasome dans un modèle de néphropathie diabétique induite par la streptozotocine[37].

1.4.4.3.1.2 DAMPs produits du remodelage de la MEC

La dégradation enzymatique de la MEC par les métalloprotéinases matricielles (MMP) peut transformer des composants quiescents en des fragments actifs vis-à-vis des PRRs. Citons deux molécules en exemple : (i) l'acide hyaluronique, une fois dépolymérisé par des hyaluronidases, peut interagir avec les TLRs ; (ii) l'héparane sulfate (un glycosaminoglycane), dégradé par l'héparanase, semble jouer un rôle clé dans les lésions glomérulaires (les souris déficientes pour le gène de l'héparanase sont protégées vis-à-vis de la néphropathie diabétique[38]). Ces messagers provenant de la MEC peuvent aussi être directement sécrétés de manière soluble par les cellules immunes rénales en réponse à une stimulation pro-inflammatoire, ce qui entretient ces phénomènes.

1.4.4.3.1.3 DAMPS spécifiques au rein

Le rein est un organe propice à la formation de particules, notamment dans l'espace tubulaire. La protéine de Tamm-Horsfall ou uromoduline est une protéine formant des particules, sécrétée dans la partie ascendante de l'anse de Henlé, et impliquée dans la captation des débris cellulaires, des cristaux et des bactéries urinaires. Alors que cette protéine est inerte dans la lumière tubulaire, elle devient un puissant activateur des cellules dendritiques dans l'espace interstitiel en cas de rupture de la membrane basale tubulaire via TLR4 [39].

1.4.4.3.2 L'ARA est une situation de mise en jeu de l'inflammasome

En réponse à la liaison d'un DAMP sur un PRR, des cascades de signalisation intra-cellulaires se mettent en place pour aboutir à la constitution d'une réponse pro-inflammatoire de la cellule, qu'elle soit immune ou non. Un inflammasome est un complexe multi-protéique contenant un PRR, qui, ayant lié un DAMPS spécifique, oligomérisé et recrute l'adaptateur protéique ASC (*apoptosis-related speck-like protein containing a CARD*). ASC recrute ensuite la caspase-1, conduisant à la production d'IL-1 β . Quatre inflammasomes ont été décrits à ce jour, dont le nom est fonction du PRR qui les compose. NLRP3 (*NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3*) est un inflammasome très étudié dans les maladies rénales. Dans le modèle d'OUU, les souris déficientes en NLRP3 présentent une résistance relative vis-à-vis de l'ARA. Dans le même travail, dans une cohorte de 43 patients porteurs de néphropathies (causes glomérulaires et non glomérulaires, à l'exclusion du diabète), l'analyse de l'ARN messager a montré une surexpression de NLRP3 [40]. La figure 10 récapitule les bases moléculaires du concept d'inflammation stérile, d'après [41-43].

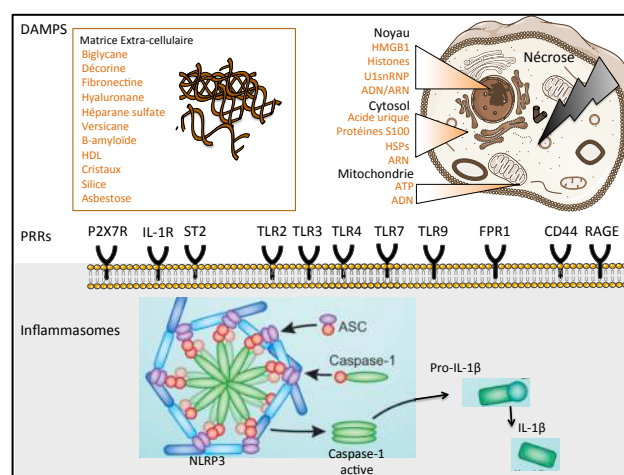


Figure 10 : Bases moléculaires de l'inflammation stérile.

Abréviations : FPR1, formyl peptide receptor 1; HMGB1, high-mobility group box 1; HSP, heat shock protein; IL, interleukin; IL-1R, IL-1 receptor; RAGE, receptor for advanced glycation end products; U1 small nuclear ribonucleoprotein particle. HDL, high density lipoproteins ; ASC apoptosis-related speck-like protein containing a CARD.

1.4.4.3 L'ARA est un équivalent de « priming » immunologique

Un point curieux est l'état d'hyperréactivité au sepsis de certains patients en situation d'ARA. Il semblerait que l'ARA puisse « re-programmer » le rein et le rendre hypersensible aux événements septiques. Il a été montré que l'ARA déclenche des remaniements de la chromatine en faveur de l'activation de gènes pro-inflammatoires. Via STE-1 (une méthyltransférase) et BRG-1 (un échangeur d'histones), des modifications épigénétiques (méthylation, acétylation, échange de variant d'histones) sont induites. L'ARA amplifie la liaison de la polymérase RNA Pol II au promoteur du TNF- α en réponse au LPS [31]. L'ARA augmente *in fine* la production de cytokines pro-inflammatoires. Cet effet s'ajoute à la réduction physiologique du DFG, qui a pour effet de diminuer la clairance des cytokines donc d'en augmenter les taux circulants. Ces processus participent notamment à la défaillance multi-organe et au dialogue mis en jeu entre les organes en situation d'ARA et de sepsis. C'est là que la transition entre ARA et MRC est floue, dans la mesure où certains phénomènes très aigus vont aboutir à des modifications fixées, parfois irréversibles.

1.4.4.4 Phénomènes inflammatoires tardifs dans la MRC

La première phase de la fibrose est inflammatoire. La figure 11 pose les bases d'une participation du système immunitaire dans les lésions de fibrose. Après la phase initiale de production de cytokines pro-inflammatoires et de signaux de danger, les cellules immunes peuvent continuer à intervenir en libérant des facteurs de croissance, des cytokines pro-fibrotiques, qui vont entretenir le dépôt de MEC.

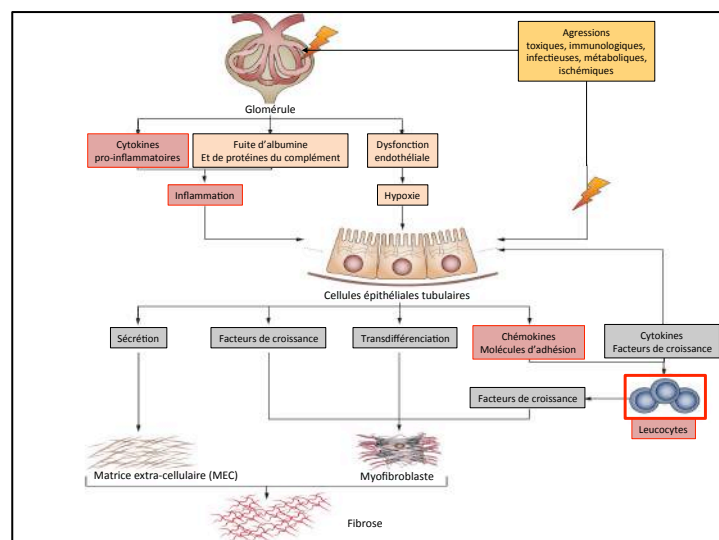


Figure 11 : Fibrose rénale, importance du système immunitaire (en encadré rouge).

D'après[44]

Pour nuancer, il faut ajouter que réduire l'inflammation ne réduit pas forcément la fibrose. Par exemple, les cellules dendritiques en condition d'OUU promeuvent l'inflammation mais ne jouent pas de rôle dans les lésions de fibrose [45].

1.4.4.5 Facteurs de progression de la MRC après une ARA

Qu'est-ce qui détermine le caractère fibrotique d'une cicatrice ? Pourquoi certains patients récupèrent-ils d'une ARA tandis que d'autres développent une MRC ? Il semblerait que l'état des cellules, du microenvironnement, donc de l'organe *in fine*, dépend de la balance entre des phénomènes pro-fibrotiques d'une part (apoptose, dédifférenciation, inflammation), et anti-fibrotiques d'autre part (réparation, régénération, processus anti-inflammatoires). Si la réparation est adaptée, la récupération est totale.

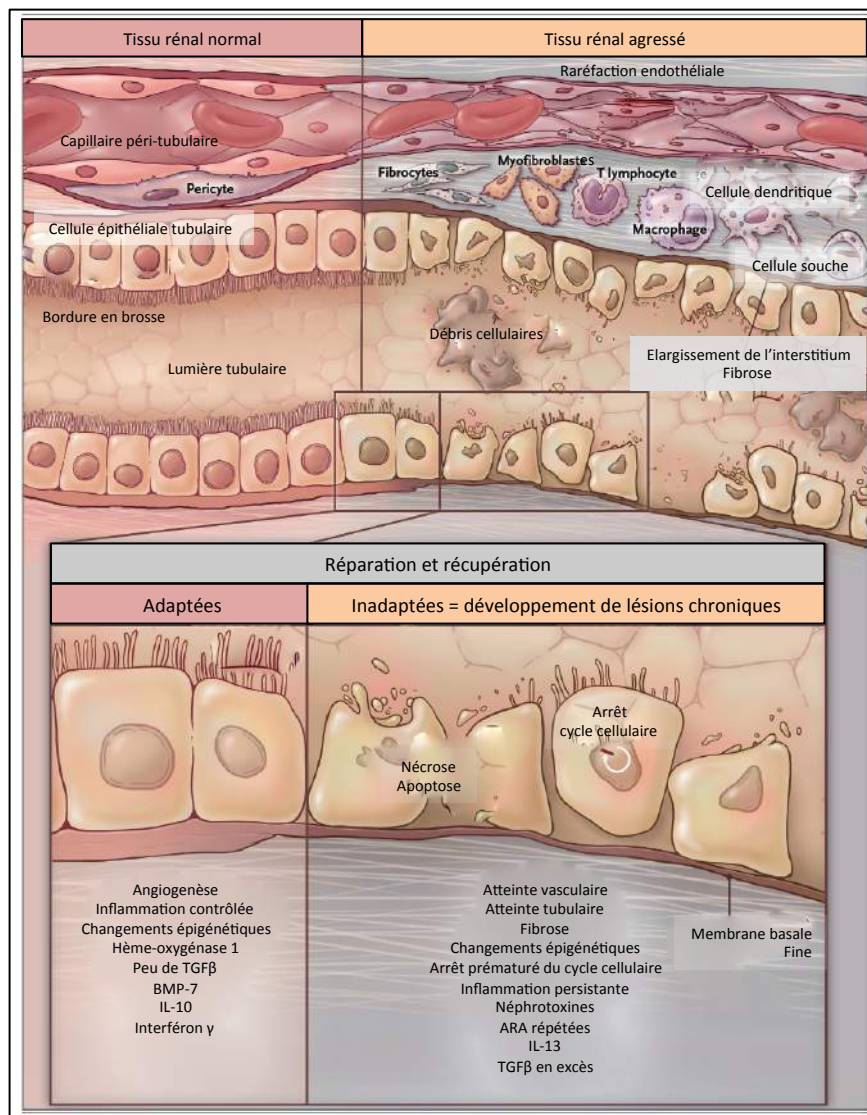


Figure 12: Mécanismes physiopathologiques à l'origine de la MRC après une ARA.

D'après[14]. BMP-7 : Bone morphogenic protein 7.

Ces phénomènes se déroulent de manière différentielle et hétérogène au sein des sous-types de cellules du rein. Leur dérégulation chronique ou leur interaction détermine l'étendue de la fibrose[14].

Conclusion

Ainsi les maladies rénales apparaissent-elles une préoccupation en matière de santé publique, d'enjeux thérapeutiques et de connaissances physiopathologiques. S'intéresser aux phénomènes inflammatoires précoces aigus peut avoir une retombée directe sur la fibrose de l'organe à long terme.

2. Données fondamentales sur la polarisation des macrophages

Avant-propos

L'inflammation rénale met en jeu des composants chimiques (comme les chimiokines) et des composants cellulaires, comme les lymphocytes, les phagocytes, les mastocytes et les fibroblastes.

Le système des phagocytes mononucléés (en anglais, *mononuclear phagocyte system* ou MPS) paraît très intéressant par ses propriétés de plasticité et de diversité. L'implication des macrophages dans les néphropathies est très étudiée et fera l'objet du chapitre 3.

Mais avant, nous allons aborder successivement :

- les caractéristiques du MPS en matière de biologie cellulaire
- le concept de polarisation du MPS
- les limites du concept de polarisation du MPS

2.1 Définition

Le système MPS comprend toutes les cellules immunes myéloïdes à l'exception des polynucléaires neutrophiles, c'est-à-dire l'ensemble des monocytes, macrophages (Mø) et cellules dendritiques (DCs). Le MPS est défini sur la base de l'origine hématopoïétique des cellules et de leur activité de phagocytose. Le MPS joue un rôle crucial dans l'homéostasie tissulaire.

2.2 Historique

Prix Nobel de Médecine et de Physiologie en 1908 aux côtés de Paul Ehrlich, Elie Metchnikoff a joué un rôle majeur dans l'identification des « macrophages » en les opposant aux « microphages » (polynucléaires neutrophiles), voir figure 13. Déjà à l'époque, leur grande hétérogénéité cellulaire, en matière de cinétique et de contribution à l'élimination, la capture et la destruction des micro-organismes au cours de l'inflammation aiguë ou chronique apparaissait au premier plan[46].

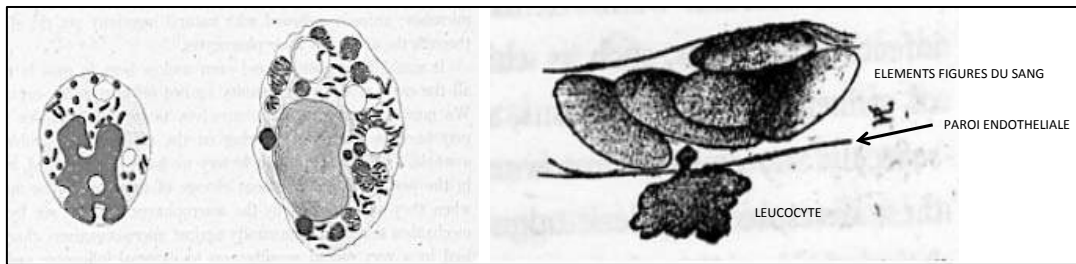


Figure 13: Illustrations d'Elie Metchnikoff (1891, 1905).

De gauche à droite : un microphage, un macrophage et le processus de diapédèse d'un leucocyte au travers d'un capillaire.

Plus de cent ans après, les recherches scientifiques sur les Mø ont conduit à la publication d'environ 200 000 travaux visant à mieux les caractériser.

2.3 Spécialisation des macrophages selon leur localisation anatomique

Certains Mø sont hautement spécialisés dans une fonction tissulaire, e.g. les ostéoclastes dans l'os, les Mø alvéolaires dans le poumon, les histiocytes dans le tissu conjonctif et les cellules de Küpffer dans le foie. Les organes lymphoïdes secondaires contiennent également des populations de Mø très particuliers, comme les Mø de la zone marginale de la rate (qui empêchent la réactivité du système immunitaire adaptatif envers les cellules apoptotiques) ou les Mø des sinus sous-capsulaires des ganglions (impliqués dans les réponses antivirales). Les sites immunologiquement privilégiés (cerveau, chambre antérieure de l'œil et testicule) possèdent également des Mø spécifiques. Le rein quant à lui n'est pas caractérisé par des Mø spécifiques d'une fonction physiologique *a priori*.

2.4 Caractérisation des macrophages

Nous allons voir que la caractérisation des macrophages nécessite de prendre en compte plusieurs niveaux d'étude : leur origine hématopoïétique, leur phénotype de surface, leur activité transcriptionnelle et leur fonction.

2.4.1 Ontogénie des macrophages

2.4.1.1 Les macrophages dérivent des monocytes du sang

Jusqu'à présent, le dogme établi par van Furth (à l'origine du concept de MPS) était que les Mø se trouvant dans les tissus provenaient exclusivement du recrutement constant des monocytes du sang. Ainsi, monocytes et Mø ont-ils longtemps été vus comme deux types cellulaires reliés, émanant d'un processus de différenciation continu. Selon ce processus de différenciation, représenté figure 14, on admet que la cellule souche hématopoïétique (HSC) donne le progéniteur des granulocytes et Mø (GMP), qui devient le précurseur commun aux Mø et DCs (MDP), dont dérive le progéniteur commun des monocytes (cMoP). A l'état physiologique, les monocytes circulent dans le sang sous deux états bien distincts, soit exprimant fortement le Ly6C (Ly6C^{hi}) soit exprimant faiblement le Ly6C (Ly6C^{low}). Alors que les Ly6C^{low} semblent impliqués dans la surveillance de l'endothélium et circulent pendant plusieurs jours, les Ly6C^{hi} ont une courte demi-vie (20 heures) et sont recrutés par les tissus où ils donnent naissance aux phagocytes mononucléés tissulaires (Mø et DCs) par extravasation.

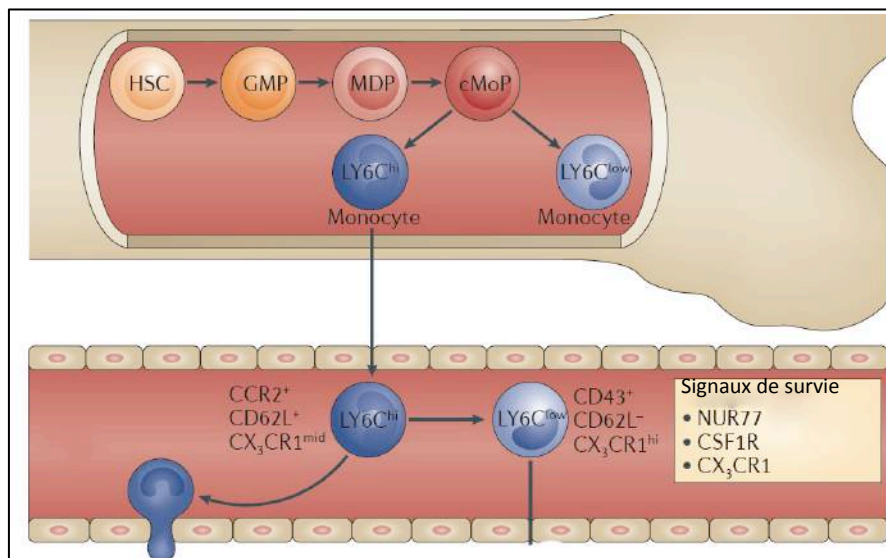


Figure 14 : Hématopoïèse des précurseurs des macrophages.

D'après [47].

2.4.1.2 Le processus de diapédèse

Les monocytes circulants sont ensuite guidés vers le tissu grâce à des gradients de chimiokines, et quittent le flux sanguin selon le processus de diapédèse (figure 15).

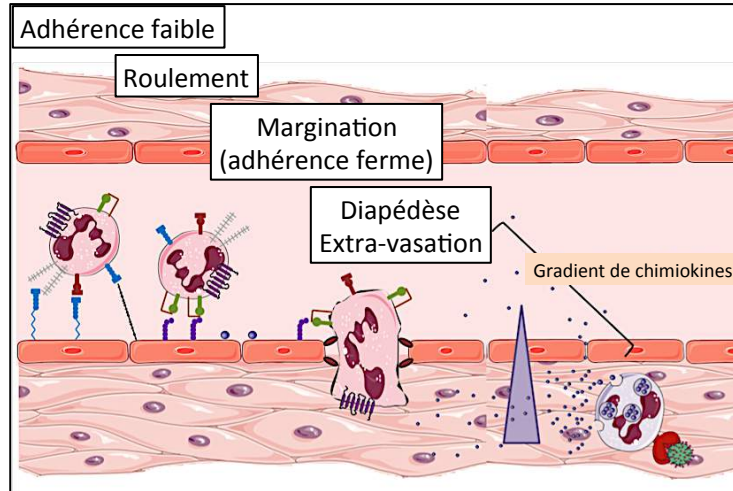


Figure 15: Diapédèse des monocytes sanguins. D'après Cavailé, 2013

De très nombreuses molécules sont impliquées dans le « trafficking » des monocytes et Mø.

Les molécules les plus significatives et leurs ligands sont répertoriés ci-dessous :

Molécule	Partenaires de liaison	Fonctions
<i>Chemokines et leurs récepteurs</i>		
CCR2	CCL2, CCL7 et CCL12	Sortie de la moelle osseuse des Ly6C ^{hi}
CX3CR1	CX3CL1	Patrouille, recrutement splénique
CCR1, CCR5	CCL3 et CCL5	Recrutement dans les tissus lors de l'inflammation
CCR6	CCL20	Migration dans les tissus lors de l'inflammation
CCR7, CCR8	CCL19, CCL1, respectivement	Migration des DCs dérivées des monocytes de la peau vers le ganglion
CXCR2	MIF	Rétention dans les plaques d'athérosclérose
<i>Molécules d'adhésion</i>		
L sélectine	CD34 GLYCAM1 MADCAM1	Roulement
PSGL1	P sélectine, E sélectine	Roulement
MAC1	ICAM1	Adhésion lors de l'inflammation
VLA4	VCAM1	Adhésion lors de l'inflammation
PECAM1	Endothéliale PCAM1	Migration transendothéliale

Figure 16 : Molécules impliquées dans le recrutement des monocytes.

D'après [48]. CCL, CC-chemokine ligand; CCR, CC-chemokine receptor; CX₃CL1, CX₃C-chemokine ligand 1; CX₃CR1, CX₃C-chemokine receptor 1; CXCR2, CXC-chemokine receptor 2; DC, cellule dendritique; GLYCAM1, glycosylation-dependent cell adhesion molecule 1; ICAM1, intercellular adhesion molecule 1; MAC1, macrophage receptor 1; MADCAM1, mucosal addressin cell adhesion molecule 1; MIF, macrophage migration inhibitory factor; PECAM1, platelet endothelial cell adhesion molecule; PSGL1, P-selectin glycoprotein ligand 1; VCAM1, vascular cell adhesion molecule 1; VLA4, very late antigen 4.

Par exemple, la délétion de Ccl2 ou Ccl7 diminue le recrutement des monocytes de 40 à 50% dans un contexte infectieux [49].

2.4.1.3 Tous les macrophages ne sont pas dérivés des monocytes du sang

S'il est certain que ces phénomènes sont majeurs, notamment lors de l'inflammation, des données récentes indiquent que certains Mø dérivent de précurseurs embryonnaires distincts des monocytes[47]. Le sac vitellin pourrait être la source exclusive de populations de Mø spécifiques du tissu adulte, qui persisteraient au-delà de la période embryonnaire. La proportion de Mø issus du sac vitellin (hématopoïèse primitive) par opposition aux Mø issus des HSC (hématopoïèse définitive) est variable selon les tissus : alors que les monocytes alimentent en permanence le réservoir de Mø dans la peau et les intestins, les populations cellulaires cérébrales de la microglie semblent dériver exclusivement du sac vitellin [50]. En ce qui concerne le tissu rénal, les données sont minces : dans des souris invalidées pour le gène *Myb*, nécessaire à l'hématopoïèse définitive, une étude rapporte la présence de Mø dérivés du sac vitellin dans le rein [51]. A ce jour, on ne peut pas préciser la provenance exacte des Mø du tissu rénal[47].

2.4.1.4 Durée de vie des macrophages et capacités de prolifération

Les Mø sont considérés comme des cellules quiescentes, à longue durée de vie (2-8 semaines) dont la différenciation est terminale et les capacités de prolifération sont limitées. Cela dit, des observations indiquent que les Mø pourraient proliférer indépendamment de l'arrivée de monocytes dans certaines conditions e.g. dans contexte T_H2 (les Mø pleuraux sont capables d'auto-renouvellement après infection par *Litomosoides sigmodontis* en réponse à l'IL-4)[52]. Il reste encore à déterminer si tous les Mø au sein d'un tissu ont le même potentiel de prolifération, et si des cellules souches pour les Mø tissulaires existent. Un facteur qui semble essentiel à la prolifération homéostatique des Mø est le CSF-1 pour *colony-stimulating factor 1* ou M-CSF pour *macrophage colony-stimulating factor*, impliqué par exemple dans la prolifération des Mø au cours de la prolifération du myomètre utérin lors de la grossesse.

2.4.2 Identification des macrophages par leur phénotype de surface

Les Mø sont régulièrement identifiés par la présence de protéines membranaires, dont les plus classiques sont reportées dans le tableau ci-dessous :

Nom	Gene	Expression
CD45	<i>Ptprc</i>	antigène commun à tous les leucocytes
CD11b	<i>Itgam</i>	cellules de la lignée myéloïde
CD11c	<i>Itgax</i>	cellules dérivées des monocytes, dont les macrophages, enrichi dans certaines populations de dendritiques
F4/80	<i>Emr1</i>	la plupart des macrophages tissulaires murins
CD68	<i>Cd68</i>	tous les macrophages
CSF1R	<i>Csf1r</i>	toutes les cellules monocytaires
Ly6G	<i>Ly6g</i>	enrichi dans les polynucléaires neutrophiles
Ly6C	<i>Ly6c1</i>	enrichi dans la lignée myéloïde monocyttaire
CD163	<i>Cd163</i>	la plupart des macrophages tissulaires murins
IL-4ra	<i>Il4ra</i>	la plupart des macrophages, mais aussi par les lymphocytes et autres cellules pouvant répondre à IL-4 ou IL-13

Figure 17: Marqueurs de surface cellulaire utilisés pour la caractérisation des macrophages.

D'après [53]. *Csf1r*, colony stimulating factor 1 receptor; *Emr1*, EGF-like module containing, mucin-like, hormone receptor-like sequence 1; *Il4ra*, interleukin-4 receptor, α ; *Itgam*, integrin α -M; *Itgax*, integrin α -X; *Ly6*, lymphocyte antigen 6 ; *Ptprc*, Protein tyrosine phosphatase, receptor type, C.

Le F4/80 est utilisé de manière universelle en tant que marqueur des Mø. Il s'agit d'une glycoprotéine de 160 kDa, récepteur transmembranaire à 7 domaines couplé à une protéine G, codée par le gène *Emr1* (*EGF-like module-containing mucin-like receptor protein*). La fonction exacte de cette molécule est encore inconnue, mais celle-ci semble être indispensable au développement des T régulateurs (T_{reg}) dans un modèle de déviation immunitaire associée à la chambre antérieure de l'œil[54].

Un autre marqueur particulièrement intéressant pour la caractérisation des Mø est le Ly6B ou antigène 7/4. Très exprimé par les Mø récemment recrutés dans le tissu, il est absent de la surface des Mø résidents déjà présents dans le tissu. Il est peu utilisé en regard des autres marqueurs de surface, et aucune donnée n'est disponible à ce jour sur son expression par les Mø rénaux [55, 56].

La majorité de ces marqueurs est utile pour établir la présence de Mø dans un tissu, en terme quantitatif. Sur le plan technique, l'immunohistochimie, malgré ses avantages (coupes fixées, accès aux biopsies humaines), se révèle parfois insuffisante à discriminer l'expression des marqueurs protéiques de manière fine, car la réponse est binaire de type marquage « oui/non », semi-quantitative au mieux. La cytométrie a donc été préférée pour réaliser des phénotypages plus sensibles et complets. Cette technique permet : d'une part de préciser le niveau d'expression d'un marqueur de manière continue (faiblement, modérément, ou fortement exprimé : e.g. F4/80 low, medium, high) et quantifiable (par la mesure de la MFI, l'intensité moyenne de fluorescence), d'autre part de combiner les marqueurs

entre eux, jusqu'à atteindre une complexité parfois déroutante (15 marqueurs membranaires étudiés à la fois).

Une question difficile est la distinction précise entre monocytes, Mø et DCs, dans la mesure où les marqueurs manquent de spécificité pour définir une population. Prenons l'exemple de la distinction entre les Mø et les DCs. Mø et DCs partagent les fonctions de phagocytes professionnels. Classiquement, les DCs ont une capacité de migration dans les ganglions lymphatiques, contrairement aux Mø. A l'heure actuelle, on reconnaît 3 grands types de DCs:

- conventionnelles (cDCs) : elles peuvent être soit XCR1+ (dont le rôle est la cross-présentation de l'antigène pour les lymphocytes T CD8), soit CD172α+ (dont le rôle est l'induction de T_H2 et T_H17). Les CD172α+ expriment aussi le CD11b.
- plasmacytoïdes (pDCs), dont le rôle est la production d'interférons IFN au cours de la réponse virale. Les pDCs expriment aussi LY6C.
- dérivées des monocytes (moDCs), dont le rôle est la promotion de réponses T locales et la promotion de l'inflammation. Les moDCs expriment aussi LY6C.

La distinction entre les cDCs d'un côté, et les moDCs-Mø de l'autre, est possible grâce aux molécules de la famille des FcγR (récepteurs pour le fragment Fc des immunoglobulines). Plusieurs études sur des modèles murins chimériques ont permis d'établir que les cDCs et pDCs expriment les FcγR inhibiteurs FcγR IIB (faible affinité IgG), alors que les moDCs et Mø expriment les FcγR activateurs FcγR I (haute affinité IgG), dont l'expression est augmentée lors de l'activation cellulaire [57]. La distinction entre les moDCs d'un côté, et les Mø de l'autre, quant à elle, reste controversée. Certaines études se sont basées sur l'expression du CD11c, caractéristique des moDCs. Les Mø sont F4/80+ alors que les DCs sont CD11c+MHC-II+. Cependant, la plupart des Mø, si ce n'est tous, expriment le CD11c de manière faible ou intermédiaire. Il en est de même pour le F4/80, exprimé par certaines moDCs (70% des CD11c+ du rein), et absent chez certains Mø [53]. Si les marqueurs membranaires permettent d'authentifier la présence des cellules du MPS, leur utilisation à visée d'identification reste incomplète en dépit de leur combinaison.

2.4.3 Identification des macrophages par leur activité transcriptionnelle

2.4.3.1 Le concept de polarisation M1/M2

Une approche complémentaire pour caractériser les Mø s'intéresse à leur état d'activation. Les Mø sont particulièrement sensibles à l'environnement extra-cellulaire et adoptent des programmes de différenciation différents selon les signaux perçus[58]. En particulier les chimiokines sont des déterminants majeurs de leur plasticité et de leur différenciation, qui peut s'orienter vers l'un ou l'autre de 2 phénotypes extrêmes, dits « M1 » ou « M2 », à l'instar de la nomenclature des réponses T helper « T_H1 » ou « T_H2 ».

2.4.3.1.1 Les macrophages M1, classiquement activés

L'interféron γ (IFN γ), seul ou associé à des produits microbiens (e.g. lipopolysaccharide, LPS), des cytokines (e.g. *tumor necrosis factor*, TNF) ou des facteurs de croissance comme le *granulocyte-macrophage colony stimulating factor* (GM-CSF), polarisent les Mø vers le phénotype M1. L'**activation classique** se caractérise par : une forte capacité de présentation de l'antigène, une production élevée d'interleukine IL-12 et IL-23, l'orientation de l'immunité adaptative vers le type I, et une production élevée d'intermédiaires (oxyde nitrique (NO), et espèces radicalaires dérivées de l'oxygène (ROS)).

2.4.3.1.2 Les macrophages M2, alternativement activés

L'IL-4, l'IL-13 et le M-CSF induisent eux un programme d'activation différent, au-delà de la simple inhibition de l'activation macrophagique. L'**activation alternative** se caractérise par : une faible production d'IL-12, une orientation de l'immunité adaptative vers le type II, des propriétés d'immuno-régulation et de remodelage tissulaire.

2.4.3.2 Mécanismes moléculaires de la polarisation

Pour disséquer les mécanismes moléculaires de la polarisation des Mø, on les stimule *in vitro* avec des cytokines, et l'on mesure les changements en matière d'expression génique. Alors que certains facteurs de transcription sont maintenus de manière constante dans le Mø afin de garantir son « identité » via la régulation globale du génome (e.g. PU.1), d'autres facteurs de transcription, dits « polarisants », ont été identifiés.

Les principales voies de signalisation intracellulaire sont représentées dans le schéma ci-après. La polarisation M1 implique entre autres les facteurs de la famille des *signal transducer and activator of transcription* (STAT1, 2 et 5), l'*interferon-regulatory factor 5* (IRF5) et la voie classique de *nuclear factor-kB* (NF-kB). La polarisation M2 requiert STAT6, le *peroxisome proliferator-activated receptor g* (PPAR gamma) ou IRF4. Un point important est que ces voies de signalisation, aboutissant à un phénotype M1 ou M2, sont mutuellement exclusives dans la mesure où un engagement de la cellule vers M1

déclenche des signaux qui vont contrecarrer un engagement de la cellule vers M2, et vice-versa (voir figure 18). Les cellules, une fois polarisées, pourraient donc difficilement changer de phénotype, ce qui sera nuancé par la suite.

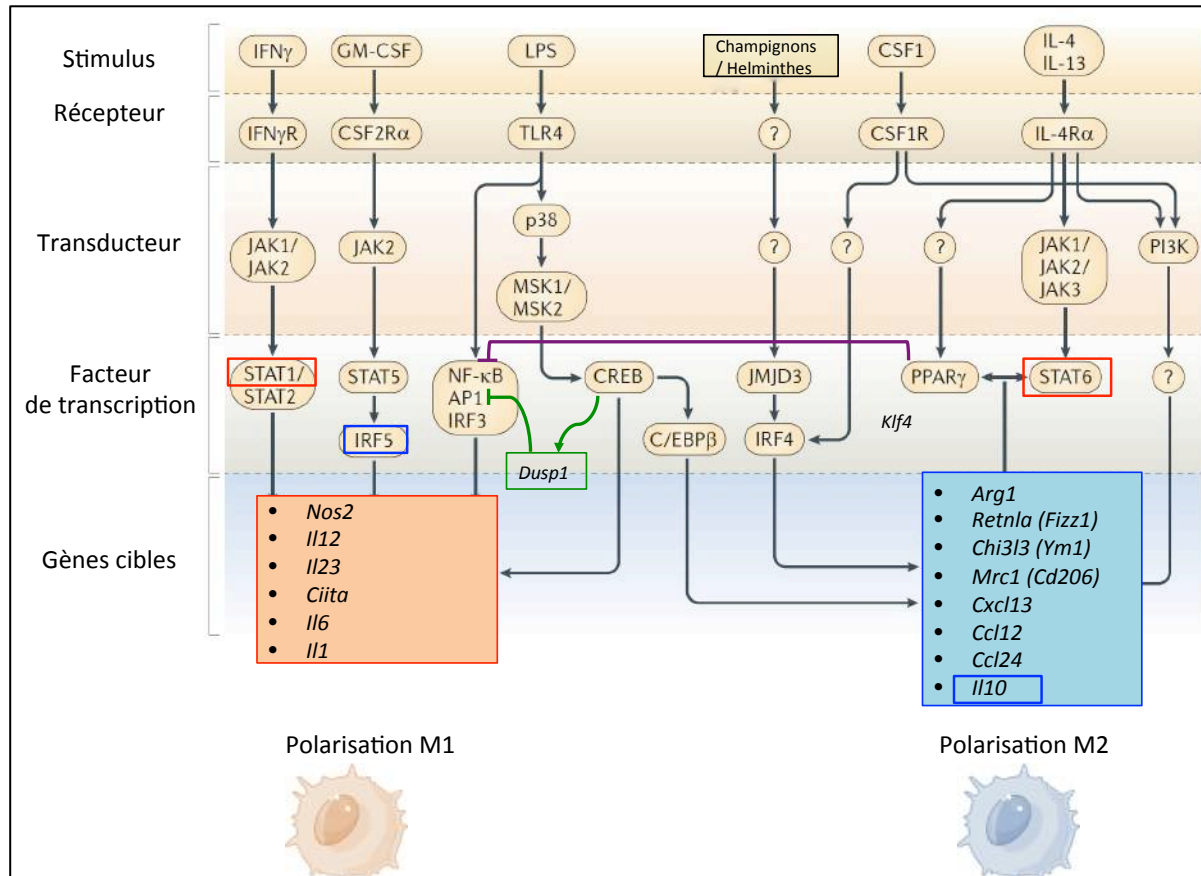


Figure 18: Voies de signalisation impliquées dans la polarisation des macrophages.

D'après [58] Un stimulus initial conduit à l'activation de facteurs de transcription spécifiques. En couleur, 4 exemples où l'activation d'une voie inhibe l'autre voie (concept d'exclusion mutuelle) : en rouge, STAT1 inhibe STAT6, en bleu IRF5 réprime la transcription d'Il10, en vert Dusp-1 régule négativement AP1, en violet PPARgamma transréprime NF- B et AP1. *AP1*: activator protein 1; *Arg1*, arginase 1; *C/EBPbeta*, CCAAT/enhancer-binding protein-beta; *Ccl*, CC-chemokine ligand; *Chi3l3*, chitinase 3-like 3; *Ciita*, MHC class II transactivator; *Cxcl13*, CXC-chemokine ligand 13; *CREB*, cAMP-responsive element-binding protein; *CSF*, colony-stimulating factor; *Dusp1*, dual specificity protein phosphatase 1; *IFNgamma*, interferon-gamma; *IL*, interleukin; *IRF*, interferon-regulatory factor; *JAK*, Janus kinase; *Klf4*, Krüppel-like factor 4; *LPS*, lipopolysaccharide; *Mrc1*, macrophage mannose receptor 1; *MSK*, mitogen- and stress-activated kinase; *NF-kB*, nuclear factor-kappa-B; *Nos2*, nitric oxide synthase 2; *PI3K*, phosphoinositide 3-kinase; *PPARgamma*, peroxisome proliferator-activated receptor-gamma; *Retnla*, resistin-like-alpha; *STAT*, signal transducer and activator of transcription; *TLR4*, Toll-like receptor 4.

Le concept M1/M2 a évolué, tenant compte de la possibilité que les cellules soient exposées à plusieurs ligands simultanément. Mantovani a ainsi complété la nomenclature en définissant 3 sous-types de M2 (a, b, c), qui expriment des répertoires cytokiniques différents [59].

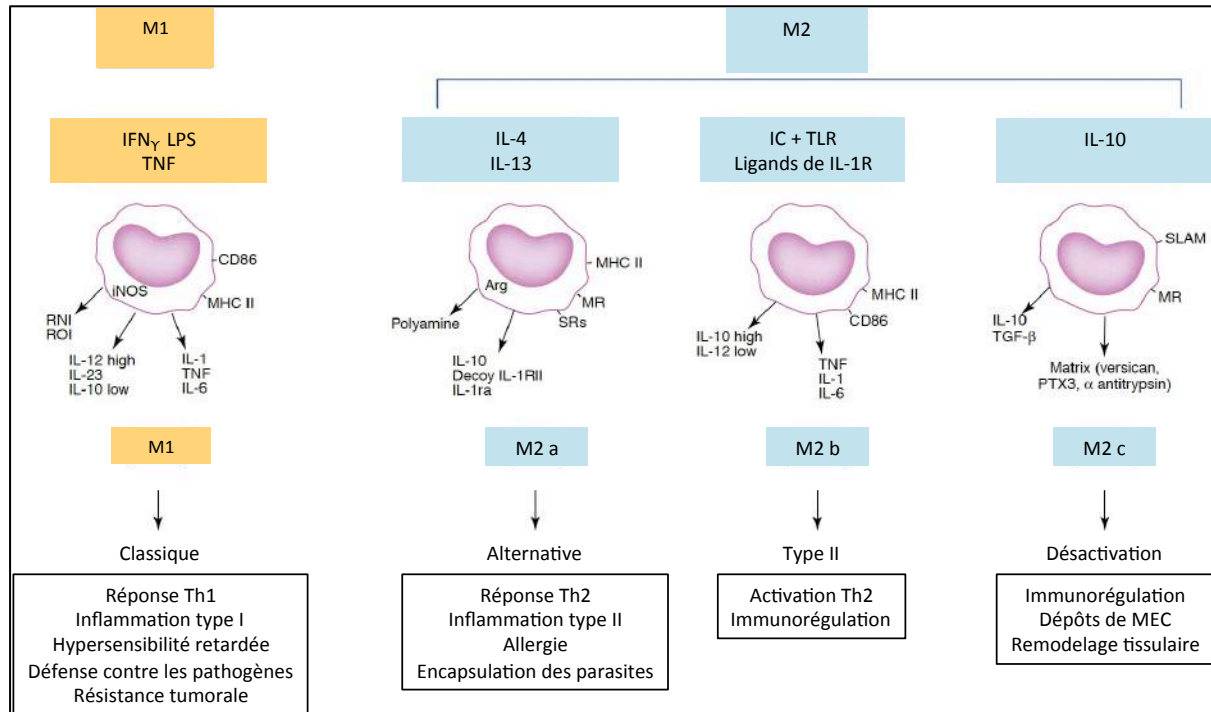


Figure 19 Différents sous-types de macrophages M2.

D'après [59]. IC, complexes immuns; IFN- γ , interféron- γ ; iNOS, inducible nitric oxide synthase; LPS, lipopolysaccharide; MR, récepteur du mannose; PTX3, the long pentraxin PTX3; RNI, reactive nitrogen intermediates; ROI, reactive oxygen intermediates; SLAM, signaling lymphocytic activation molecule; SRs, récepteurs scavengers; TLR, Toll-like récepteurs.

Après les M2 a, b et c, ont été décrits des M_{reg} pour « M ϕ régulateurs », exprimant Foxp3, inhibant la prolifération des lymphocytes T, via la sécrétion de facteurs solubles et l'induction de la mort cellulaire, et favorisant le développement de T_{reg}. De nombreux travaux se sont intéressés à la caractérisation des M2d, ou TAMs pour « M ϕ associés aux tumeurs » [60]. A ces régulateurs « connus » de la polarisation s'ajoutent également d'autres modes de régulation comme les miRNAs, dont certains ont été identifiés (miR-124, 155, 223)[61].

2.4.3.3 Limites du concept de polarisation M1/M2

Comme toute tentative de classification, le concept de M1/M2 a donc certaines limites. Les M ϕ , au lieu de regrouper plusieurs sous-populations discrètes stables, forment un spectre continu composé de multiples phénotypes, exerçant des fonctions diverses, tant inflammatoires que réparatrices ou régulatrices. Les études *in vitro* ne reflètent pas la biologie des M ϕ *in vivo*, qui semblent passer d'un état d'activation à l'autre en réponse au microenvironnement.

Au lieu d'une polarité M1/M2, Mosser a proposé une vision de la polarisation des Mø selon une roue, dont les rayons sont labiles[62] (voir figure 20).

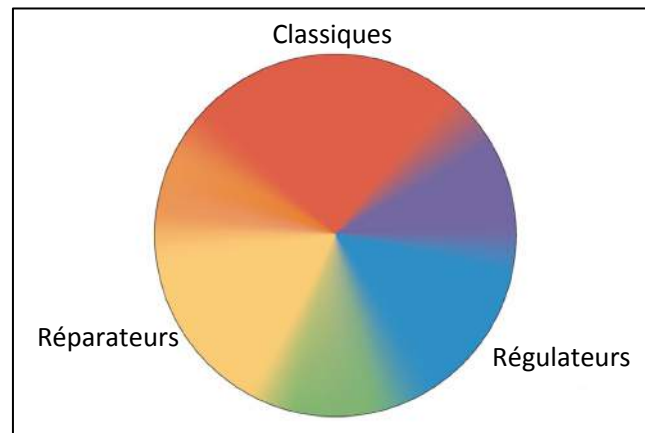


Figure 20 : Le spectre de l'activation des macrophages.

D'après [62].

Nous allons voir quels sont les facteurs qui modulent l'état d'activation des Mø et compliquent l'utilisation arbitraire des dénominations des sous-populations.

2.4.3.3.1 Facteur temps

Certaines données démontrent qu'un Mø activé par du LPS, alors incapable de réactiver des gènes pro-inflammatoires si on le re-stimule quelques heures après, peut exprimer des gènes anti-inflammatoires (tels l'IL-10)[63]. Ce défaut de réponse à une seconde stimulation est nommé « tolérance aux endotoxines »[64] et signe la possibilité des Mø de commuter du phénotype M1 vers M2. Ceci indique que les Mø, contrairement aux T_H1 et T_H2 , peuvent subir des transitions dynamiques entre les différents états. Des phénomènes épigénétiques sont également en cours de caractérisation.

2.4.3.3.2 Facteur espace

Si définir la polarisation d'un Mø *in vitro* est désormais possible quand on regarde les cadres ci-dessus, approcher une telle diversité *in vivo* relève du défi, quand on intègre aux stimuli « purs » des stimuli complexes qui sont ceux trouvés dans un environnement tissulaire. Par exemple, il a été montré récemment qu'en plus de signaux chimiques pouvant induire la polarisation, des signaux physiques pouvaient contribuer à polariser un Mø. Une elongation mécanique potentialise les effets des cytokines pro-M2, et prévient les effets médiés par les cytokines pro-M1. Ces phénomènes de polarisation par les contraintes physiques sur les cellules disparaissent en présence d'agents inhibant le cytosquelette[65].

2.4.3.3.3 Facteur individu

Les données d'expression génique ont été obtenues sur des échantillons de populations de cellules. Or, pour appréhender et décrire précisément des états de polarisation différents, de nouvelles méthodes sont désormais disponibles pour étudier la transcription à l'échelle d'une cellule individuelle (*single-cell*), par qPCR pour un panel de gènes choisis, ou par séquençage du transcriptome. Déclarée « Méthode de l'année 2013 » par le journal Nature Methods, l'étude de la transcription en *single-cell* présente de nombreux avantages :

- On peut s'affranchir d'un effet « dilution » d'information dans la mesure où une cellule peut se trouver dans un état de transition particulier, différent des cellules qui l'entourent. Son statut minoritaire peut masquer son identification.
- L'étude de la co-expression de gènes est imaginable à l'échelle de la cellule isolée. Si les gènes A et B sont co-exprimés par des cellules observées à l'échelle d'une population, on ne peut pas savoir si A et B sont exprimés par les mêmes cellules, ou si un contingent de cellules exprime A et un autre contingent de cellules exprime B. L'expression de A et B dans la même cellule indique une expression simultanée. Le calcul de coefficients de corrélation, positifs ou négatifs, permet de définir des réseaux transcriptionnels.
- Il est possible de définir la diversité inter-cellulaire et l'hétérogénéité de populations qui semblaient jusque-là homogènes en matière de morphologie, ou de marqueurs membranaires. Si ces techniques ont été très utilisées dans les études de lignée hématopoïétique, peu de données concernent les états de polarisation macrophagique.

2.4.3.3.4 Facteur espèce

Les différences entre les systèmes murin et humain modulent les interprétations de la polarisation des Mø. En particulier, les molécules effectrices sont directement dépendantes des stimuli infectieux initiaux. Or, certains pathogènes sont restreints au genre humain, et ont de fait engendré des réponses spécifiques. Enfin, certaines voies de signalisation ont subi des changements majeurs au cours de l'évolution (par exemple la famille des GTPase p47 immunity-related GTPase chez la souris comporte 20 membres, contre seulement 2 chez l'homme) [53].

Comme représenté dans la figure 21, certains marqueurs discriminants chez la souris ne sont pas applicables chez l'homme :

- soit parce qu'il n'existe pas d'homologue humain du gène en question (par exemple Ym1 et Fizz1)

- soit parce que ce gène n'est pas régulé par les mêmes cytokines chez l'homme (par exemple l'arginase, ou le CD206 dont l'expression dans des macrophages humains n'est pas différente entre les M1 et les M2 [66]).

Récemment, l'enzyme multifonctionnelle la transglutaminase 2 (TGM2) a été identifiée comme état un excellent biomarqueur de l'activation M2 commun aux deux espèces[67].

	Marqueurs	Murins & Humains	Murins	Humains
Macrophages	F4/80 CD11b CD80 CD86 CMH II CD68 CSF-1 R CD14 CD16 CD32 ICAM-1 (CD54)	X X X X X X X X X X X		
M1	Ly6G Ly6C CD62L iNOS	X X X		
M2	IL-4R IL-10R CD163 TGM2 Ym-1 Fizz-1 Arginase-1 CD206	X X X X		
			X X X X	

Figure 21 : Marqueurs macrophagiques spécifiques et communs aux espèces humaines et murines.

D'après [68], [69], [66] et [70].

2.4.4 Identification des macrophages par leur fonction biologique

Ainsi la combinaison des données membranaires et transcriptionnelle, même à l'échelle cellulaire, ne donne-t-elle pas toujours une idée du rôle biologique des Mø. C'est pourquoi il est incontournable d'étudier la fonction cellulaire. Dépléter un type cellulaire est souvent une manière de déterminer sa fonction. Plusieurs outils, dont chacun présente des avantages et des inconvénients, ont fait l'objet d'une revue récente et sont résumés ci-dessous[71].

2.4.4.1 Déplétions non génétiques

Plusieurs méthodes sont disponibles pour dépléter le MPS. Historiquement, à l'instar du sérum anti-lymphocytaire, du sérum anti-macrophages a été utilisé afin de montrer le rôle délétère de ces cellules dans l'histoire naturelle de la GN médiée par auto-anticorps anti-membrane basale glomérulaire (MBG) [72].

Un autre agent pharmacologique largement employé dans les modèles murins est le clodronate liposomal (CL). Les liposomes sont captés par les phagocytes mononucléés et une fois internalisé dans

la cellule, le clodronate (bisphosphonate) induit l'apoptose, en donnant un dérivé analogue de l'ATP, qui entre en compétition et inhibe l'ADP/ATP translocase [73]. A partir du moment où il n'y a pas de restriction d'accès aux liposomes, il semble que le MPS dans son ensemble puisse être affecté par les effets du CL.

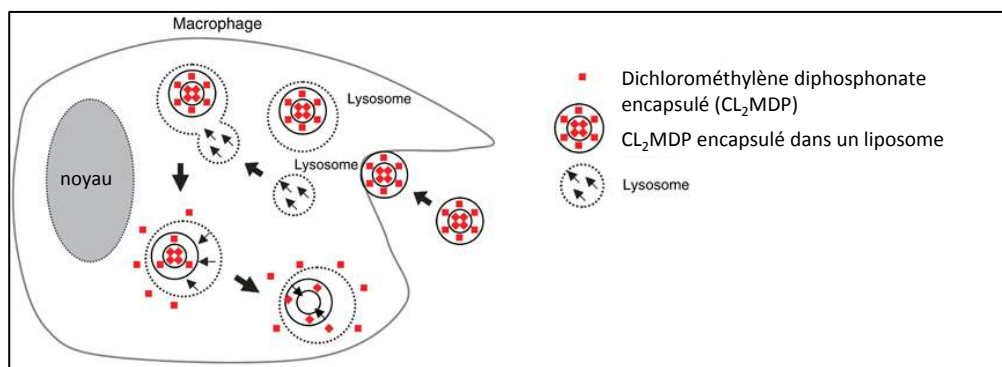


Figure 22: Déplétion du macrophage par le clodronate liposomal.

D'après[74]

A l'image du CL, des microparticules modifiant l'immunité nommées *immune-modifying microparticles* dérivées de polystyrène, de micro-diamants ou biodégradables (acide poly-lactique-co-glycolique) ont été utilisées avec succès pour dépléter les phagocytes dérivés des monocytes, via une séquestration splénique et une apoptose [75].

Une autre possibilité est l'utilisation d'anticorps neutralisant le CSF1-R (cf figure 14) dont nous avons vu qu'il était exprimé de manière ubiquitaire dans le MPS. Alternativement, la signalisation du CSF1-R peut être bloquée en aval du récepteur par l'utilisation d'inhibiteurs de kinases. D'autres anticorps comme ED7, ciblant l'intégrine CD11b/CD18, ont été utilisés [76].

Les inconvénients de ces approches sont les effets très larges sur le MPS, donc sur des populations très hétérogènes, et le risque que la mort des cellules mononucléées constitue en soi un signal inflammatoire. Il a notamment été démontré que le traitement par CL s'accompagnait de la libération de nucléosomes et d'ADN dans la circulation sanguine [77].

2.4.4.2 Souris transgéniques

Le récepteur humain de la toxine diphtérique (DTR) peut être utilisé pour dépléter génétiquement des populations cellulaires spécifiques. En effet, une fois exprimé par une cellule de souris, cette cellule meurt en présence de la toxine. Des souris transgéniques ont donc été générées pour exprimer ce gène sous le contrôle d'un promoteur spécifique d'une lignée cellulaire. Pour l'étude du MPS, plusieurs promoteurs ont été utilisés : CD11b, CD169, CD11c.

Une limitation de cette technique est que la plupart des cellules du MPS sont vite renouvelées, ce qui requiert une ré-injection de la toxine diphtérique de manière régulière. Une immunisation progressive des souris vis à vis de la toxine risque d'entraîner une baisse d'efficacité. La génération d'un dérivé « stable » de la toxine diphtérique, le fragment A (DTA), exprimé dans un système Cre-lox, permet de pallier ce problème (souris CD11c-Cre x Rosa26-stopflox-DTA) [71].

Malheureusement les promoteurs utilisés manquent de spécificité, sont exprimés par plusieurs cellules du MPS, et l'induction de la mort de cellules immunes constitue en soi un potentiel stimulus inflammatoire.

Conclusion

La caractérisation des cellules du MPS est un enjeu difficile : « entre identité et diversité ». La combinaison des approches technologiques augmente chaque jour la quantité de données disponibles sur ce type cellulaire, mais complexifie l'analyse. La prise en compte du contexte spatio-temporel dans lequel ces cellules évoluent est primordiale.

3. Polarisation des macrophages dans le rein

Avant-propos

Les cellules du MPS sont donc des cellules « plastiques » qui peuvent jouer des rôles très différents selon leur état de polarité. Désormais, nous allons nous focaliser sur les macrophages (Mø), en gardant à l'esprit que ce terme, incomplet, peut aussi englober des cellules de type dendritique ou monocyttaire, selon les critères pris en compte pour les définir.

Dans le contexte des maladies rénales, ces cellules ont souvent été étudiées, dans les situations d'agression rénale aiguë, ou de fibrose. Un élément récent est la prise en compte de l'importance du phénotype des Mø dans le contrôle du pronostic néphrologique à long terme [78, 79]. La polarisation des Mø est devenue un déterminant fort de la balance entre régénération et atrophie tubulaire.

Le chapitre présent est dédié aux caractéristiques des Mø dans le tissu rénal :

- en condition d'homéostasie
- en condition d'agression (pathologique et expérimentale).

3.1 Données sur les macrophages rénaux en condition d'homéostasie

Compte tenu de la diversité des phénotypes de Mø, il est fondamental de distinguer l'état basal de l'état inflammatoire. Très peu de données sont disponibles sur les populations de Mø dans le rein normal.

3.1.1 Topographie dans le rein

Les Mø dans le rein normal ont été identifiés à l'aide du F4/80 en 1983[80]. La majorité des Mø est localisée dans l'interstitium médullaire. Une minorité de Mø est trouvée au contact des tubules corticaux proximaux, distaux, et autour de la capsule de Bowman. Les Mø font partie intégrante de l'appareil juxta-glomérulaire (probablement pour leur sécrétion de prostaglandines). En condition homéostatique, les cellules immunes résidentes du rein sont absentes des glomérules.

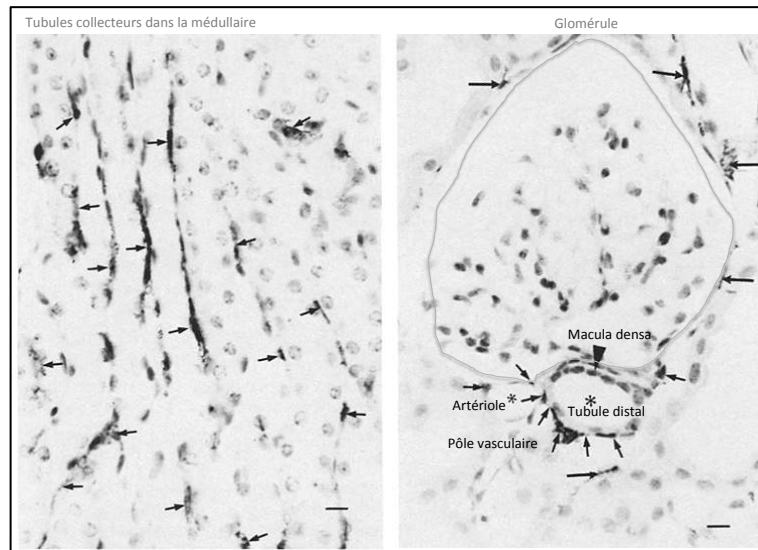


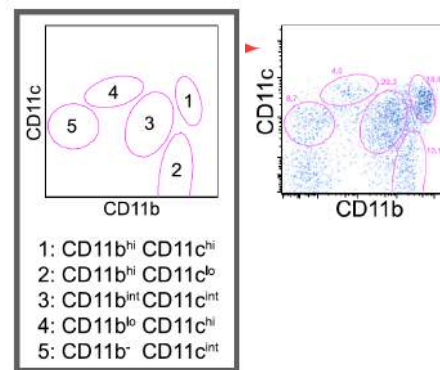
Figure 23 : Localisation des Mø dans le tissu rénal (flèches).

D'après Hume, 1983.

De manière intéressante, ces différentes sous-populations sont présentes dans l'interstitium rénal cortical mais ne semblent pas présenter de répartition topographique spécifique au sein du cortex[81]. Par contre, la localisation corticale ou médullaire des cellules peut traduire des fonctionnalités différentes. Alors que les DCs du cortex dépendent de la signalisation par *CX3 chemokine receptor 1* (CX3CR1, récepteur de la fractalkine), présentent l'antigène aux Thelper, et sont impliquées dans la progression de la GN induite par sérum néphrotoxique, les DCs de la médullaire, plutôt impliquées dans le recrutement des neutrophiles en cas d'infection bactérienne, sont indépendantes du CX3CR1 [82].

3.1.2 Phénotype des sous-populations

Le phénotype des Mø dans le rein normal était peu décrit, jusqu'à ce qu'une étude, dédiée aux cellules du MPS rénal murin, soit publiée en 2013 [81]. La stratégie en cytométrie en flux appliquée par les auteurs est la suivante, détaillée dans la figure 23 : (i) définir les cellules du MPS sur la positivité du CD45 et la négativité des marqueurs CD3e, CD19, CD49b, Ly6G (exclusion des lymphocytes et des granulocytes) (ii) analyser l'expression différentielle des deux marqueurs consensuels : CD11c et CD11b. Cinq populations discrètes sont identifiables. La combinaison de marqueurs de surface et d'expression génique de certaines cytokines permet de préciser des phénotypes et fonctions différentes.



	F4/80	Ly6c	CD14	CD16	CX3CR1	CCR2	CSF1R	MHCII	CD103	Zbtb46	Batf3	Irf8	CCR7	IL-10
1: CD11b ^{high} CD11c ^{high}	+	—	+	++	+	+++	++	++	—	++	±	—	+	±
2: CD11b ^{high} CD11c ^{low}	+	+	+	+	+	++	++	— ~ +	—	—	±	±	—	+
3: CD11b ^{int} CD11c ^{int}	++	—	++	+	++	+	+++	++	—	—	±	±	—	++
4: CD11b ^{low} CD11c ^{high}	—	—	—	+	±	±	+	+	+	++	++	++	++	—
5: CD11b ^{lo} CD11c ^{int}	—	—	—	—	N.A.	±	—	—	—	—	—	+	±	—

Figure 24 : Cinq sous-populations de macrophages sont identifiées dans le rein normal.

D'après Kawakami, 2013.

Parmi les cinq sous populations, les cellules **CD11b^{int}CD11c^{int}F4/80^{high}** (région 3 sur le schéma ci-dessus) sont les plus abondantes dans le rein normal. Elles se caractérisent par une production importante d'IL-10, et un potentiel de stimulation de la différenciation des T_{reg}. Leur faible degré d'expression de CCR2, et le fait qu'elles aient été identifiées comme provenant de la vague d'hématopoïèse primitive [51], indiquent une origine distincte de la région 1. Ces cellules requièrent la signalisation du CSF1-R, et il a été montré que cette voie était nécessaire à la réparation rénale. Au total, cette fraction de Mø, majoritaires en situation physiologique, semble jouer un **rôle anti-inflammatoire endogène**.

La seconde population la plus abondante est constituée de cellules **CD11b^{high}CD11c^{high}F4/80^{low}** (région 1 sur le schéma ci-dessus). Ces cellules expriment Ccr7 à haut niveau, présentent une forte capacité de présentation de l'antigène et de stimulation de la différenciation des T_{reg} et pourraient correspondre à des DCs dans la mesure où elles expriment Flt3. Paradoxalement, elles expriment

fortement Ccr2 et CX3CR1, ce qui en ferait d'avantage des **Mø inflammatoires**, d'autant qu'elles ont une signature TNF- α et IL-1 β .

Cette étude met en évidence une population rare (région 4 sur le schéma ci-dessus) CD103⁺CD11b^{low}CD11c^{high}, ayant une grande capacité de présentation d'antigène et un potentiel de stimulation des cellules T_{H1}. Ces cellules ne semblent pas dériver des monocytes, mais plutôt appartenir à la famille des cDCs, compte tenu de leur haut niveau d'expression des facteurs de transcription Zbtb46, Batf3, Id2 et Irf8.

Une autre étude très récente s'attache à la caractérisation des cellules F4/80⁺CD11c⁺ dans le rein normal. Il ressort que l'expression de CD11c, même en combinaison avec une forte expression du CMH II, n'est pas un critère suffisant pour définir les DCs dans le rein, et que la population de MHC-II⁺F4/80⁺CD11c⁺CD11b⁺CD68⁺CD103⁻ correspond fonctionnellement à des Mø[83].

Au total :

Même si leur origine hématopoïétique n'est pas complètement élucidée, les CD11b^{int}CD11c^{int}F4/80^{high} et les CD11b^{high}CD11c^{high}F4/80^{low} sont les deux populations les plus retrouvées dans le rein normal. A ce jour, au moins cinq publications indépendantes consacrées à l'étude des Mø rénaux les distinguent sur le CD11b et le F4/80[51, 81, 84-86].

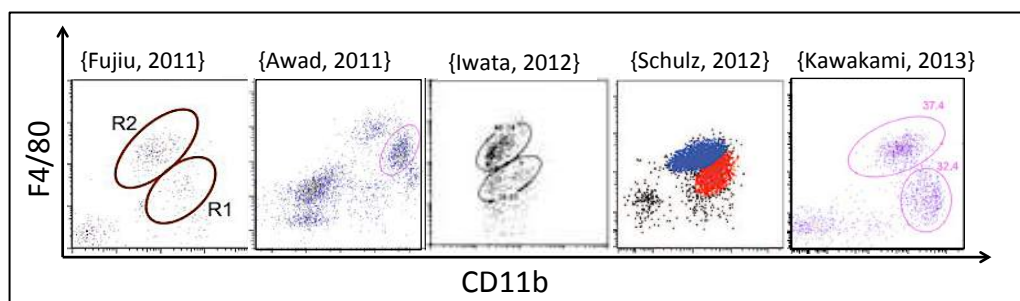


Figure 25 : Deux sous-populations majoritaires de macrophages sont retrouvées dans le rein normal.

NB : Dotplot d'Iwata ne montrant que les CD11b.

En synthétisant les données publiées, les CD11b^{int}F4/80^{high} ont une activité transcriptionnelle en faveur du phénotype M2 (IL-10, TGF- β), et les CD11b^{high}F4/80^{low} une activité transcriptionnelle en faveur du phénotype M1 (IL-1 β , CCL2). Cependant, tous les auteurs s'accordent à dire que les caractéristiques des Mø *in vivo* sont distinctes des Mø polarisés *in vitro* (marqueurs M1/M2 co-exprimés, ou absents).

3.2 Données sur les macrophages rénaux en condition d'agression

En condition d'ARA, le nombre et le phénotype des Mø sont modifiés de manière drastique. Nous allons voir que les Mø peuvent jouer des rôles ambivalents, et que des effets opposés peuvent être observés selon les Mø, les modèles, et la cinétique de la pathologie dont il est question.

3.2.1 Les macrophages peuvent contribuer à aggraver la pathologie rénale.

3.2.1.1 L'infiltration macrophagique est un facteur de mauvais pronostic.

La présence de Mø en grand nombre sur une biopsie rénale humaine est un critère de mauvais pronostic. Une corrélation a été décrite entre l'étendue d'un marquage des Mø en immunohisto-chimie (souvent le CD68), une évolution défavorable de la fonction rénale et/ou l'apparition d'une protéinurie. En situation d'allo-immunité, les Mø représentent 38-60% de l'infiltrat leucocytaire en situation de rejet[87]. La présence de Mø CX3CR1⁺ sur une biopsie de greffon en rejet est associée à une mauvaise réponse à la corticothérapie et une évolution défavorable à 1 an [88]. En situation de rein natif, des observations similaires sont rapportées, e.g. dans la maladie à « lésions glomérulaires minimes »[89] ou la polykystose autosomique récessive[90]. Ci-dessous l'exemple de la survie rénale dans une cohorte de 62 patients atteints de néphropathie à dépôts mésangiaux d'IgA, en fonction du score histologique de l'infiltrat macrophagique[91].

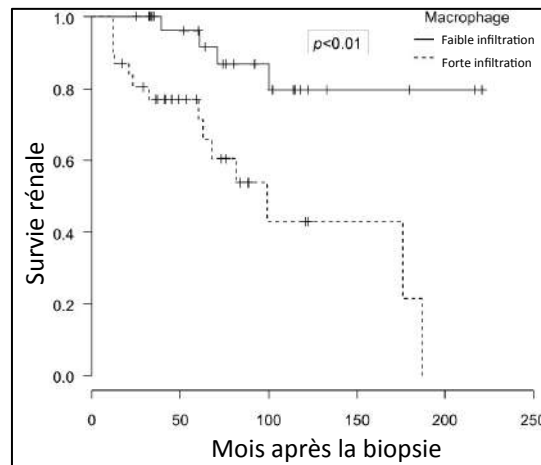


Figure 26: L'infiltration du tissu rénal par les macrophages est un facteur de mauvais pronostic.

D'après [91]

Ainsi l'infiltration des Mø semble-t-elle un mécanisme conservé, mis en jeu dans toutes les situations d'agression rénale. Tubule et glomérule lésés produisent des cytokines pro-inflammatoires (type IL-6, IL-8 et CCL2), qui favorisent le recrutement du MPS. Le MPS s'infiltré dans le tissu de manière rapide et intense (dès une heure dans l'I/R[92]). L'utilisation de souris chimériques, reconstituées avec

une moelle osseuse exprimant la *green fluorescent protein* GFP, soumises à une OUU, montre que l'infiltrat cellulaire est majoritairement d'origine hématopoïétique [93]. Si personne ne conteste la présence du MPS dans les lésions rénales, sa fonction biologique reste soumise à débat, dans le sens où les mesures d'association ne sont pas nécessairement des mesures de causalité. C'est pourquoi d'autres travaux ont été menés pour démontrer le rôle délétère des Mø dans les néphropathies.

3.2.1.2 Les Mø pro-inflammatoires contribuent aux lésions rénales.

3.2.1.2.1 La polarisation des Mø est altérée dans certaines néphropathies expérimentales

Dans la néphropathie diabétique (modèle streptozotocine), le phénotype des Mø est altéré dès six semaines dans le sens d'un ratio M1/M2 significativement augmenté [94]. Dans la néphropathie lupique spontanée (lignée MRL-Fas lpr), les Mø sont activés à l'état basal. Les M1 (définis comme exprimant fortement iNOS, TNF- α , CD86 et IL-12) sont plus nombreux. Fait intéressant, les Mø sont résistants à la commutation phénotypique vers M2 (CD206, IL-10, Ym1) en raison d'une production dérégulée de CSF-1 par les cellules tubulaires qui entretiennent le phénotype M1 [86].

3.2.1.2.2 Les Mø amplifient la production de cytokines inflammatoires

Le rôle délétère des Mø a été établi par les **expériences de déplétion**, qui ont montré qu'en l'absence de Mø, l'expression de cytokines inflammatoires était réduite, et le pronostic rénal amélioré.

(i) Une irradiation corporelle totale après OUU atténue les lésions rénales. Cette protection est perdue suite à une injection de RAW264.7 (lignée de Mø murins)[93].

(ii) Expériences de déplétion pharmacologique.

- Dans l'I/R. Chez la souris, un pré-traitement par clodronate liposomal (CL) réduit les lésions observées 24 heures après une ischémie de 30 minutes. Cette protection est perdue si les souris reçoivent un transfert adoptif de RAW264.7. L'effet délétère est attribué à la production d'IL-6 et de TGF- β ²⁸. Chez le rat, un pré-traitement par clodronate liposomal (CL) réduit les lésions observées 4 heures, 24 heures et 72 heures après une ischémie de 40 minutes. L'effet bénéfique est relié à une réduction de l'expression d'IL-6, TNF- α , IL-1 β et CCL2 [95, 96]. La protection conférée par le CL est perdue après un transfert adoptif de Mø pro-inflammatoires polarisés *ex vivo* (pendant 24 heures avec de l'IFN- γ) [97].
- Dans l'OUU, la déplétion par CL à J-3, J-2, J+2, J+4 prévient la fibrose via la réduction des cytokines TNF- α et TGF- β [98]. Ces effets semblent restreints aux Mø, puisque la déplétion des lymphocytes T CD4⁺ s'accompagne au contraire d'aggravation des lésions[99].

(iii) Expériences de déplétion génétique. La déplétion de Mø via une immuno-toxine recombinante dirigée contre FcγRI (un récepteur majeur de l'activation des Mø) est protectrice dans un modèle d'I/R chez le rat [100]. La déplétion des CD11b dans l'OUU est également bénéfique [101, 102].

Le rôle potentiellement délétère des Mø a été également identifié au cours d'expériences de **transferts adoptifs**, qui ont montré la pathogénicité directe des Mø. Dans un modèle de néphropathie à l'adriamycine, hyalinose segmentaire et focale expérimentale, alors que le transfert de F4/80⁺CD11c⁺ n'a pas d'effet, un transfert adoptif de cellules F4/80⁺CD11c⁺ ou F4/80⁺CD11c⁻ est délétère sur la structure et la fonction rénales à un mois[83]. Dans le même modèle, le rôle primordial des Mø a été mis en avant lorsque le phénotype rénal a pu être retrouvé dans des souris SCID (dépourvues de lymphocytes). L'injection de Mø isolés de la rate, polarisés M1 (avec du LPS) ou M2 (IL-4 et IL-13) a été suivie d'effets opposés : aggravation du phénotype par les M1, protection par les M2. Un fait marquant est que la quantité de Mø injectés, très faible (de l'ordre de 10 000) est suffisante pour observer l'aggravation du phénotype, ce qui montre la puissance des effets immunologiques [103].

Enfin, un argument pour le rôle délétère des Mø pro-inflammatoires a été apporté par **l'antagonisation d'une cytokine**. Dans un modèle de néphropathie d'Alport (atteinte héréditaire de la membrane basale glomérulaire par déficit en chaîne α3 ou α4 du collagène de type IV), l'injection d'ADN bactérien accélère le cours de la néphropathie. Un phénotype de Mø M1 CD11b⁺Ly6C^{hi} est noté, et associé à la production intra rénale de NO, TNF-α, IL-12, et CXCL10, effets abolis par l'utilisation d'éta nercept (anti TNF-) [104].

3.2.1.2.3 Les Mø sont à l'origine de lésion directe des cellules rénales

Les Mø par leur présence directe ou la sécrétion de médiateurs paracrines, peuvent également contribuer à la lésion directe des cellules rénales. Dans un modèle murin de GN auto-immune, la réalisation de transferts adoptifs de Mø (dérivés de la moelle et d'une lignée NR8383) démontre l'implication de ces cellules dans la survenue de la protéinurie, la prolifération cellulaire glomérulaire et l'hypercellularité mésangiale [105]. Plus récemment, dans la néphropathie diabétique (modèle streptozotocine), la communication entre Mø et cellules rénales a bien été décrite à l'aide d'un modèle transgénique CD11b-DTR. En réponse à l'hyperglycémie, les podocytes vont favoriser le recrutement des Mø M1. Les M1 altèrent la cohésion structurale entre les podocytes en induisant la diminution de l'expression de néphrine et podocine et en augmentant la perméabilité de la MBG [94].

Un autre argument pour le rôle délétère des Mø vis-à-vis des podocytes et des cellules épithéliales tubulaires est l'effet bénéfique d'un inhibiteur oral de MIF (*macrophage migration inhibitory factor*, une cytokine activatrice des Mø) chez des souris diabétiques db/db [106].

3.2.1.2.4 Les Mø participent à la fibrose rénale

Les Mø peuvent produire une MMP-9 qui, en clivant l'ostéopontine, génère un fragment doué de propriétés chimotactiques envers les Mø et favorise le phénotype pro-fibrosant des cellules épithéliales rénales. Ceci a été démontré dans l'OUU et la GN par injection de sérum néphrotoxique [107, 108].

Les Mø synthétisent également des composants de la MEC telle la fibronectine [109].

Au total :

Le caractère infiltrant des Mø est péjoratif dans les études cliniques. Les modèles murins révèlent que les Mø de type pro-inflammatoires (M1 pour certains) sont délétères pour le tissu rénal par la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, la production de MEC, la lésion des cellules rénales. A l'inverse, d'autres Mø, davantage « réparateurs » (M2 pour certains) peuvent exercer des actions bénéfiques.

3.2.2 Les Mø peuvent ralentir le cours évolutif de la pathologie rénale.

Plusieurs articles rapportent un rôle bénéfique des Mø dans la mesure où :

(i) leur absence aggrave le pronostic rénal. La déplétion de Mø en contexte d'OUU via une leucopénie induite par le cyclophosphamide aggrave les lésions rénales à J14, qui sont moindres si un transfert adoptif de Mø de moelle est réalisé [110].

(ii) leur ajout améliore le pronostic. L'injection de M2 (dérivés de splénocytes traités par IL-4 et IL-13) réduit efficacement le développement de la fibrose tubulo-interstitielle dans un modèle murin de néphropathie diabétique [111].

Plusieurs hypothèses sont évoquées pour étayer les mécanismes par lesquels les Mø peuvent être néphroprotecteurs.

3.2.2.1 Les Mø peuvent favoriser un profil cytokinique anti-inflammatoire

Les Mø peuvent sécréter de l'IL-10 (anti-inflammatoire). Dans l'I/R, une injection de Mø surexprimant l'IL-10 se révèle protectrice dès une heure après la reperfusion. Le profil inflammatoire local est diminué, et l'effet protecteur des Mø est associé à une augmentation de la lipocaline-2 (protéine pro-régénérative)[112]. Dans le modèle de néphropathie induite par le cisplatine, la déplétion des CD11c⁺ aggrave les lésions à cause d'une diminution de l'IL-10 [113].

Les Mø peuvent bloquer l'action de l'IL-1 (pro-inflammatoire). La transfection de cellules CD11b⁺CD18⁺ dérivées de la moelle osseuse avec le gène de l'antagoniste du récepteur à l'IL-1 confère une résistance à la néphropathie médiée par les anticorps anti-MBG [114]. De manière similaire, l'expression par les Mø du récepteur de type 1 à l'angiotensine semble atténuer les effets délétères de l'IL-1β dans un modèle d'obstruction [115].

Les Mø peuvent réduire le recrutement des autres Mø (via la baisse de l'expression des récepteurs aux chimiokines et chimiokines elles-mêmes). Plusieurs mécanismes sont impliqués dans l'extinction de l'inflammation stérile :

- le facteur de transcription HIF (*hypoxia-inducible factor*), dont l'activation dans les Mø rénaux en situation d'OUU conduit à l'atténuation de la réponse inflammatoire. HIF peut également moduler la polarisation des Mø vers le phénotype M2 [116].
- le récepteur SIGIRR (*single Ig IL-1-related receptor*), dont l'expression par les cellules myéloïdes au cours de l'I/R rénale permet la diminution de l'excrétion de CXCL2, CCL2, et IL-6[117].
- l'IRF4 (*IFN regulatory factor 4*), inhibiteur de la signalisation du LPS sur le TLR4, dont l'expression par les DCs au cours de l'I/R rénale permet la diminution de l'excrétion de TNF- α [118].

3.2.2.2 Les Mø peuvent favoriser la régénération épithéliale des cellules rénales

Plusieurs arguments indiquent que les Mø peuvent exercer des actions trophiques sur les cellules rénales.

In vitro, des cellules murines de tubule proximal (MPT) exposées au 2-désoxyglucose voient leur taux de prolifération diminuer *via* une déplétion en ATP. Une fois remises en culture dans un milieu normal, le taux de prolifération se normalise. Il a été montré que la co-culture des MPT avec des Mø de type M2 (polarisés avec IL-4) accélérât la prolifération des MPT de manière significative, au contraire de la co-culture avec des Mø de type M1 (polarisés avec IFN- γ). Ces mécanismes semblent impliquer des médiateurs solubles (indépendants de l'IL-4) [97]. Un candidat potentiel est Wnt7b, qui, sécrété par les Mø, favorise la progression des cellules épithéliales dans le cycle cellulaire et la réparation de la membrane basale en stimulant la voie de Wnt/ β -caténine [119].

In vivo, trois à cinq jours après une I/R, le nombre de cellules épithéliales en prolifération, attesté par le marqueur Ki-67⁺, est réduit de 45% si les Mø M2 sont déplétés par le CL. Les lésions et la fonction rénale sont aggravées par la déplétion tardive des Mø, ce qui indique un rôle protecteur [97]. De même, dans un modèle de lésion spécifique des cellules tubulaires proximales, une déplétion des Mø durant la phase de réparation retarde la régénération tubulaire et aggrave les lésions. Il a été démontré qu'un médiateur clé de la signalisation entre les cellules tubulaires et les Mø était le facteur CSF-1, responsable de l'expansion et de la polarisation des Mø vers le phénotype M2 [92]. Enfin, des souris invalidées pour le facteur SOCS-3 (*suppressor of cytokine signaling 3*) dans les cellules tubulaires proximales, dans lesquelles le phénotype rénal M2 est dominant, montrent une prolifération tubulaire significativement augmentée en contexte de néphropathie à l'acide aristolochique ou après I/R [120].

Les M2 stimulent donc la prolifération tubulaire : cet avantage en situation d'ARA peut devenir un inconvénient en situation d'excès de prolifération comme c'est le cas dans les maladies rénales kystiques. Dans un modèle de polykystose autosomique dominante murin (cpk/cpk), les Mø M2 (définis par F4/80⁺CD11c⁻Ly6c^{low}) sont plus nombreux dans le rein, par comparaison aux souris sauvages. La déplétion avec du CL administré entre 3 et 7 jours de vie s'accompagne d'une préservation partielle de l'architecture du rein et d'une réduction de l'index de taille des kystes. Il semblerait que les cellules tubulaires recrutent les M2 *via* CCL2 et CXCL-16, et que les M2 en retour stimulent leur prolifération via des facteurs solubles encore non identifiés [121]. Des résultats similaires ont été obtenus avec des cellules humaines provenant de patients atteints de la polykystose récessive [122].

3.2.2.3 Les Mø peuvent contribuer à la réparation de l'architecture du tissu

Les Mø dits « réparateurs » ou M2 sont caractérisés par une expression des récepteurs du mannose, initialement étudié pour les propriétés anti-parasitaires. La famille des récepteurs du mannose (MR) regroupe des récepteurs membranaires impliqués dans l'endocytose : le premier est MRC1 ou CD206, le second est MRC2 ou CD280. L'inactivation génétique de Mrc1 ou Mrc2 s'accompagne d'un défaut de capture du collagène extra-cellulaire par les Mø M2 dans le tissu dermique [123]. Dans le rein, les atteintes rénales liées à une OUU sont majorées dans des souris déficientes en Mrc2 (présentant davantage de collagène). Le CD206, au-delà d'être un marqueur des M2, pourrait donc être associé à l'exercice d'une fonction anti-fibrosante dans le rein. Dans un modèle d'OUU réversible, la proportion de Mø M2 exprimant le CD206 augmente avec la réparation tissulaire à 7 jours [124].

3.2.2.4 Les Mø peuvent moduler le système immunitaire adaptatif

Il est communément admis que les Mø peuvent induire une tolérance vis-à-vis du système immunitaire adaptatif. Dans le modèle de néphropathie induite par l'adriamycine, la néphroprotection conférée par l'injection de M2c (stimulés par IL-10 et TGF- β) est attribuée à la désactivation des Mø endogènes, l'inhibition de la prolifération des lymphocytes T CD4⁺, et l'induction de T_{reg} dans les ganglions de drainage. Cette propriété des M2c d'induire des T_{reg} est liée à l'expression de B7-H4, molécule de co-stimulation, absente des M2a [125]. En retour, il semble que les T_{reg} puissent aussi moduler le phénotype des Mø, comme le suggère l'utilisation d'un anticorps superagoniste pour le CD28, qui, en augmentant les T_{reg} *in vivo*, augmente les Mø CD163⁺, et accélère la réparation d'une GN induite par sérum néphrotoxique [126].

Au total :

Les modèles murins révèlent que les Mø de type anti-inflammatoire (M2 pour certains) sont bénéfiques pour le tissu rénal par la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires, le remodelage de la matrice extra-cellulaire en excès, la favorisation de la régénération des cellules tubulaires, ou encore la régulation des réponses adaptatives.

3.2.3 Que conclure du rôle des Mø dans les néphropathies ?

3.2.3.1 Précautions utiles dans l'interprétation des données expérimentales

Nous avons donc vu successivement des effets opposés des Mø selon leur type, le contexte, le modèle d'étude. Comme résumé par Griffin, et représenté dans la figure 27, les stratégies de déplétion des Mø dans les situations de néphropathie conduisent à des effets opposés [127]:

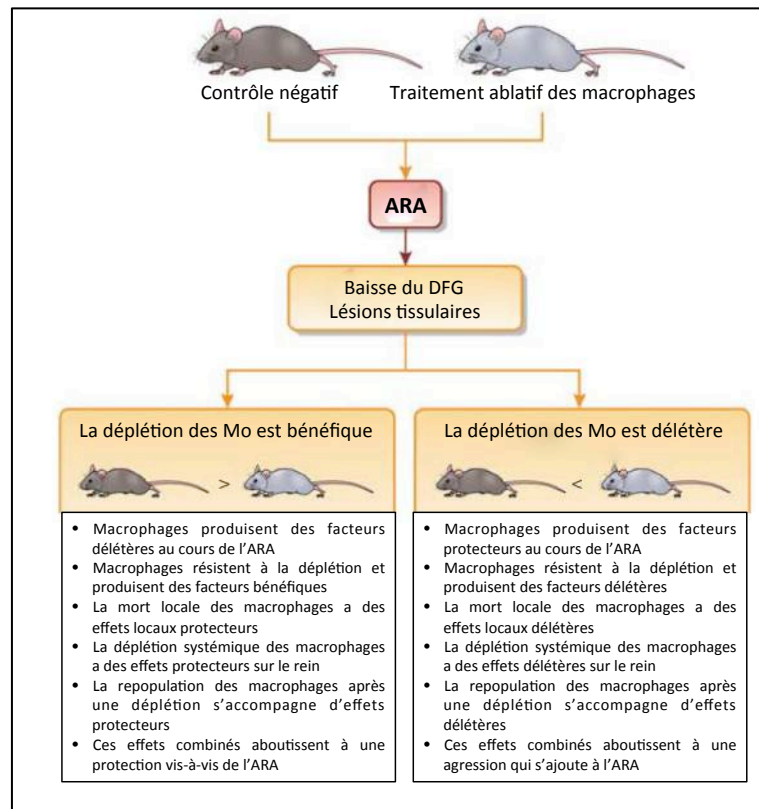


Figure 27 : Effets opposés de la déplétion des macrophages.

D'après [127]

Pour expliquer cette contradiction, il faut prendre en compte le fait que le mode de déplétion des Mø a une incidence sur le type d'effet observé. Les données de Ferenbach ajoutent un degré de complexité : dans un modèle de souris transgéniques CD11b-DTR, la déplétion de tous les CD11b n'a aucun effet sur la fonction rénale 24h après I/R. Si les Mø étaient tous délétères, on s'attendrait à ce que leur déplétion améliore les lésions. Or, ni aggravation ni amélioration ne sont notées. Si le CL est utilisé, on note une amélioration du pronostic rénal, mais celle-ci est perdue si le CL est combiné avec la

déplétion CD11b-DTR. Deux explications sont proposées : (i) la déplétion par CD11b-DTR est plus puissante que par le CL en matière d'amplitude de réponse sur les cellules circulantes et concerne aussi les CD11c⁺ (alors que CL ne les déplete quasiment pas) (ii) le CL épargne une sous-population réno-protectrice de Mø exprimant le marqueur M2 CD206⁺, néanmoins déplétée par la DT[128]. Cette population de Mø CD206⁺ réparateurs serait soit moins sensible au CL en raison d'une phagocytose amoindrie, ou d'une localisation tissulaire dans un compartiment inaccessible au CL. **Il ne s'agit donc pas de conclure que les Mø sont bénéfiques ou délétères dans le rein, mais bien de définir de quel type de Mø il est question et à quel moment.**

3.2.3.2 La commutation phénotypique semble indispensable à la réparation.

La cinétique de polarisation des Mø au cours de l'ARA est un déterminant majeur du pronostic rénal à long terme. Au-delà de l'aspect manichéen des « bons » ou des « mauvais » Mø, nous allons voir que c'est leur coordination dans le temps qui est déterminante pour le devenir de l'organe, et que la résolution de l'inflammation est une étape critique.

3.2.3.2.1 Polarité bi-phasique : M1 en phase précoce, M2 en phase tardive

Il apparaît qu'en phase précoce de l'ARA, le phénotype des Mø est plutôt M1, et qu'en phase tardive, le phénotype des Mø est plutôt M2. La publication princeps en ce sens est celle de Lee et al en 2011. Ce travail démontre qu'en phase aiguë de l'I/R, dans les 48 premières heures, des Mø M1 (F4/80⁺CD11c⁻CD206⁻iNOS⁺) sont recrutés, alors qu'en phase tardive, à 7 jours, des Mø M2 (F4/80⁺CD11c⁻CD206⁺arginase-1⁺) sont dominants. Grâce au système de suivi fluorescent (PKHD26), il s'avère que les M1 injectés en phase aiguë changent de phénotype et acquièrent des caractéristiques de M2 (baisse de iNOS, hausse du CD206)[97]. Dans le modèle d'OUU, Fujiu et al décrivent le même phénomène [85]. La visualisation des phénotypes M1 et M2 est permise par l'identification de deux populations :

- M1 étant en région R1 définie par F4/80^{low}CD11b^{high}, majoritaire à J1
- M2 en région R2 définie par F4/80^{high}CD11b^{low}, majoritaire à J0 et J7.

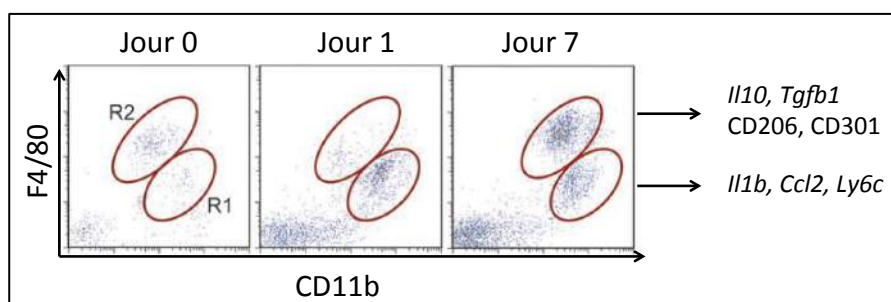


Figure 28 : Polarisation bi-phasique des macrophages.

D'après [85].

3.2.3.2.2 Importance de la commutation pro- versus anti-inflammatoire

Une étude très récente souligne le rôle de la polarisation des Mø dans le contrôle des séquelles liées à une ARA. IRAK-M est une kinase associée au récepteur à l'IL-1, et un inhibiteur de la polarisation vers M1. Une inactivation génétique d'IRAK-M n'a pas de conséquences sur le pronostic de l'ARA mais, à partir de cinq semaines après l'I/R, provoque une insuffisance rénale chronique et une fibrose où les M1 (CD11b⁺Ly6C^{hi}TNF- α ⁺) sont majoritaires. Les conclusions des auteurs sont les suivantes :

- une régénération efficace du rein nécessite la résolution de l'inflammation
- la résolution de l'inflammation est un processus actif qui nécessite l'induction de gènes (tel IRAK-M) qui désactivent les Mø pro-inflammatoires
- une seule modification génétique suffit à transformer une ARA en MRC, ce qui souligne l'importance de déterminants individuels dans les susceptibilités.

Pour le bon déroulement de la résolution de l'inflammation, aussi paradoxal que cela puisse paraître, certains DAMPS sont indispensables, comme la protéine S100A9 exprimée par les Mø en différenciation. Les souris déficientes pour le gène S100A9 montrent un défaut de réparation après I/R et la persistance de lésions de fibrose. Au lieu de la persistance de M1 comme dans le travail sus-cité, les auteurs rapportent un phénotype M2 dominant, sur la base de l'expression d'Arg-1 et d'IRF4. On peut regretter que l'étude des M1/M2 n'ait pas été réalisée sur cellules isolées en cytométrie mais sur le rein total, et que le phénotypage ne repose que sur deux cibles [129].

Ainsi la simplification M1/M2 ne correspond-elle pas à la réalité, et la définition des populations et des fonctions nécessite-t-elle une grande prudence. L'accumulation des connaissances expérimentales sur l'implication des Mø dans les néphropathies a suggéré que ces cellules puissent être manipulées à des fins thérapeutiques.

3.3 La manipulation du MPS dans les néphropathies : futur ou réalité ?

3.3.1 Les stratégies de déplétion : utiles pour la recherche fondamentale

Comme nous l'avons vu précédemment, les stratégies de déplétion des Mø par des agents pharmacologiques (type CL) présentent des inconvénients. Le manque de données sur la sécurité d'emploi ou la spécificité des effets empêche de considérer ces outils comme des thérapeutiques, bien qu'ils soient très précieux pour la recherche fondamentale.

3.3.2 Les transferts adoptifs : en développement

Une des stratégies possibles dans la prévention de l'ARA et/ou de la MRC secondaire est le transfert de cellules protectrices ou réparatrices. Chez l'homme, chez 2 patients receveurs de greffons obtenus chez des donneurs vivants, l'injection de Mø dits « régulateurs » ou M_{reg} a donné des résultats prometteurs en matière de fonction rénale et d'immunosuppression à 3 ans [130, 131].

Toutefois, deux points sont à considérer dans la manipulation des Mø en thérapie cellulaire.

Le premier est le type de manipulation pour polariser les Mø. Une modification génétique stable (type adénovirus) comporte le risque de transformation cancéreuse. Une polarisation par des agents cytokiniques *ex vivo* est possible, avec le respect des contraintes organisationnelles de la thérapie cellulaire.

Le second est la stabilité phénotypique des cellules injectées. Certains travaux indiquent que le phénotype des cellules injectées est maintenu dans le temps (au moins 4 semaines) [103]. Cependant, nous avons vu des Mø qu'ils se caractérisaient par une plasticité phénotypique singulière, nécessaire à l'accomplissement de programmes (notamment la résolution de l'inflammation). Un travail expérimental a porté sur l'injection de M2 dans la néphropathie à l'adriamycine, M2 obtenus soit à partir de la rate, soit à partir de la moelle osseuse. Il s'avère que les M2 de rate sont protecteurs, et stables *in vivo*. Au contraire, les M2 de moelle sont inefficaces à prévenir les lésions, et perdent leur phénotype suppresseur de l'inflammation une fois dans le tissu. Cette instabilité phénotypique est expliquée par une capacité de prolifération accrue, retrouvée comme étant dépendante du facteur M-CSF sécrété par les cellules tubulaires [132]. Outre l'absence de possibilité d'obtenir des Mø de rate chez l'homme, cette étude soulève des questions relatives à la faisabilité des transferts adoptifs.

3.3.3 Les inhibiteurs de recrutement : en développement

Une stratégie à l'étude dans le champ de l'immunologie rénale est l'inhibition du recrutement des cellules du MPS, dont nous avons vu qu'il était rapide, intense, et délétère par son côté inflammatoire. Il s'agit de bloquer l'interaction entre une chimiokine (*CC-chemokine ligand* ou Ccl) recrutant les Mø et son récepteur. Le prérequis est que le récepteur (*C-C chemokine receptor* ou Ccr) soit exprimé par les Mø lors de l'induction de la pathologie, et que ces Mø soient pathogènes.

3.3.3.1 L'axe CCL2/Ccr2

Le blocage de la liaison Ccl2/Ccr2 dans un modèle murin de syndrome d'Alport (maladie héréditaire), bien qu'effectif, s'est avéré vain, car les Mø n'influençaient pas le cours de la maladie [133]. Au contraire, le blocage s'est révélé puissant dans d'autres modèles :

- blocage par des *spiegelmer* anti-CCL2 (molécules d'ARN faites d'unité de L-ribose, oligo-nucléotides artificiels résistants aux nucléases, se liant aux peptides, protéines, et substances de bas poids moléculaire, avec la même affinité que des anticorps mais sans antigénicité) dans la néphropathie diabétique[134, 135] et la néphropathie lupique[136].
- blocage par des antagonistes du Ccr2 dans la néphropathie diabétique: RS504393 modèle Ins2Akita et streptozotocine [84], RO5234444 modèle db/db uninephrectomisé[137], CCX140-B modèle db/db en régime gras[138].

3.3.3.2 L'axe CCL-5/Ccr1

Le blocage se révèle efficace dans le modèle de néphropathie lupique : antagoniste oral non peptidique BX471 dans la lignée MRL(lpr/lpr)[139], et antagoniste oral BL5923[140].

Cette approche est séduisante dans la mesure où la prise orale de composés pourrait être ponctuelle e.g. à la phase initiale de l'ARA afin de prévenir l'afflux de cellules entretenant l'inflammation stérile.

3.3.4 L'utilisation du MPS comme vecteurs biologiques

Au lieu de considérer le recrutement du MPS comme un phénomène délétère, certains auteurs ont décidé d'en tirer profit. La capacité du MPS à phagocyter les particules en fait une cible utile de vectorisation. L'idée est de « charger » les cellules du MPS avec une substance dont on souhaite qu'elle soit active dans le tissu rénal au moment de l'ARA. Comme le MPS est recruté de manière massive, l'administration de la substance est rapide. C'est ainsi que des liposomes contenant du curcumin (puissant inhibiteur de NF- B) sont captés par le MPS et améliorent le pronostic rénal en situation d'I/R [141].

Conclusion

L'infiltration du tissu rénal par les Mø est un fait commun à la plupart des maladies rénales. De nombreuses données ont été publiées concernant le phénotype et le rôle de ces cellules dans l'évolution de la pathologie, et permettent de situer leur importance en matière de perspectives thérapeutiques.

4. Les macrophages rénaux contribuent-ils à l'évolution de la tubulopathie post-rhabdomyolyse ?

Avant propos

Une situation particulière d'agression rénale aiguë est la néphropathie liée à la rhabdomyolyse, lésion du muscle strié squelettique. A ce jour, la participation du système immunitaire dans ce type de lésions, qu'elles soient aiguës ou chroniques, est inconnue.

Le chapitre à venir aborde :

- les faits cliniques
- les faits expérimentaux décrits dans cette maladie

autant d'éléments qui nous ont incités à formuler l'hypothèse que les macrophages pouvaient non seulement voir leur phénotype modifié, mais aussi jouer un rôle majeur dans le pronostic rénal.

4.1 Définition

Le terme de « rhabdomyolyse » fait référence à une lésion du muscle strié squelettique, conduisant au relargage de constituants musculaires dans la circulation systémique.

4.2 Historique

Dans l'antiquité, des épisodes de rhabdomyolyse sont relatés suite à la consommation accidentelle de ciguë. Plus récemment, les premiers cas de rhabdomyolyse sont identifiés en 1908 au décours de séisme de Messina (Sicile) et par les médecins militaires allemands au cours de la première guerre mondiale[142]. C'est en 1940 que Bywaters et Beall publient l'évolution clinique de 4 patients victimes de bombardements et établissent, les premiers, le lien entre lésion musculaire et ARA[143]. Deux ans plus tard, le rôle pathogène de la myoglobine est identifié[144], et il faudra attendre les années 1970 pour que des causes non traumatiques de rhabdomyolyse soient considérées comme causes potentielles d'ARA.

4.3 Etiologies de la rhabdomyolyse

Les causes de rhabdomyolyse sont multiples et peuvent être résumées de la façon suivante [145]:

4.3.1 Traumatiques

Alors dénommée *crush syndrome*, la rhabdomyolyse traumatique est observée après accidents de la voie publique, tremblements de terre, ou compression d'un membre dans une position non anatomique.

4.3.2 Exercice musculaire intense

L'effort physique prolongé chez des sujets non entraînés ou pratiqué dans des conditions climatiques défavorables (forte chaleur) peut déclencher une rhabdomyolyse. Les crises d'épilepsie sont des situations équivalentes de sollicitation intense.

4.3.3 Vasculaires

Toute situation d'ischémie de membre, qu'elle soit secondaire à des embolies systémiques, locaux, ou satellite d'un geste chirurgical, peut conduire à une nécrose musculaire massive. Une situation fréquente est la compression d'un membre à l'occasion d'un épisode prolongé de perte de conscience (abus de toxique, pathologie neurologique, e.g. coma éthylique).

4.3.4 Changements brutaux de température corporelle

L'hyperthermie maligne et le syndrome malin des neuroleptiques s'accompagnent parfois d'une rhabdomyolyse, souvent aggravée par une hypokaliémie liée à l'augmentation des pertes insensibles. Les patients victimes d'électrocution présentent une rhabdomyolyse dans 10% des cas. Une hypothermie sévère peut également se compliquer de rhabdomyolyse.

4.3.5 Toxiques (médicamenteux ou non)

Cause la plus fréquente parmi les causes toxiques, l'utilisation d'hypolipémiants de type statines est une étiologie de rhabdomyolyse, surtout en cas de co-prescription avec d'autres médicaments (notamment les fibrates) ou des inhibiteurs du cytochrome P450 (amiodarone, inhibiteurs calciques, anti-fongiques azolés, macrolides) chez des personnes fragiles (âgées insuffisantes rénales). Le tableau ci-dessous recense les molécules pouvant être responsables de rhabdomyolyse et les mécanismes impliqués :

Agent toxique	Compression	Myotoxycité	Hypokaliémie	Autre
Alcool	+	+	+	Hypophosphatémie
Amphetamine				Agitation
Amphotéricin B			+	
Anti-paludéens		+		
CO monoxyde de carbone	+			Déficit énergétique, hypoxie
Cocaïne				Hyperthermie, agitation
Colchicine		+		
Cortico-stéroïdes		+		
Diurétiques			+	
Ectasy				Agitation
Fibrates		+		
Héroïne	+	+		
Inhibiteurs de l'HMG-CoA reductase statines		+		
Isoniazide		+		
Kétamine	+			Agitation, convulsions
Laxatifs			+	
Narcotiques	+			
Réglisse			+	
Sédatifs	+			
Zidovudine		+		

Figure 29 : Liste des principaux toxiques responsables de rhabdomyolyse.

Pour chacun, le mécanisme est décrit, direct par myotoxycité ou indirect (compression, hypokaliémie, ou autre). D'après [142].

A noter que certains venins [146] et plantes peuvent causer une rhabdomyolyse.

4.3.6 Infections

Les infections virales à Influenza A and B, coxsackievirus, Epstein–Barr virus, VIH, et bactériennes à *Legionella*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus* (pyomyosite), *Clostridium* sont classiquement associées à une rhabdomyolyse, même si le mécanisme causal est inconnu.

4.3.7 Troubles métaboliques et hydro-électrolytiques

L'hypokaliémie, l'hypophosphatémie, l'hypocalcémie, l'acido-cétose et l'hyperosmolarité sont des situations propices au développement d'une souffrance musculaire.

4.3.8 Myopathies métaboliques

Les maladies génétiques musculaires sont des causes exceptionnelles de rhabdomyolyse. Dès l'enfance, les patients se présentent avec des épisodes de myalgies et de myoglobulinurie à répétition. Les syndromes identifiés sont les suivants :

- Troubles de la glycolyse ou glycogénolyse : myophosphorylase (glycogénose type V), phosphofructokinase (glycogénose type VII), phosphorylase kinase (glycogénose type VIII), phosphoglycérate kinase (glycogénose type IX), phosphoglycerate mutase (glycogénose type X), lactate dehydrogenase (glycogénose type XI).
- Troubles du métabolisme lipidique : carnitine palmitoyl transferase II, long-chain acyl-CoA dehydrogenase, short-chain L-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase, medium-chain acyl-CoA dehydrogenase, very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase, medium-chain 3-ketoacyl-CoA, thiolase.
- Maladies mitochondriales : déficit en succinate dehydrogenase, cytochrome c oxidase, coenzyme Q10.
- Atteinte de la voie des pentose phosphate : déficit en glucose-6-phosphate dehydrogenase.
- Atteinte du cycle des purines nucléotidiques : myoadenylate deaminase.

Ainsi les causes de rhabdomyolyse sont-elles très hétérogènes, ce qui peut rendre compte des difficultés à recenser de manière précise l'épidémiologie de cette maladie.

4.4 Epidémiologie

Même si les patients atteints de rhabdomyolyse sont aisément identifiés cliniquement et biologiquement grâce à l'élévation des enzymes musculaires (créatine kinase (CK)), l'incidence de la rhabdomyolyse dans la population générale est difficile à estimer. Pour donner un ordre d'idée, sur une période de 15 mois, 3500 patients ont été admis en urgence dans deux hôpitaux universitaires de Boston avec un taux de CK >5000 UI/L. Les causes de rhabdomyolyse étaient associées à un traumatisme dans 26%, une compression dans 18%, un sepsis dans 10% et une chirurgie dans 15% des cas, le reste des admissions étant liées à une cause médicale [147].

4.5 Pronostic vital à court terme

L'ARA liée à la rhabdomyolyse représente 7-10% des cas d'IRA aux USA. La rhabdomyolyse se complique d'IRA dans 13 à 50% des cas, selon les études [148, 149]. La cause initiale et l'intensité de la rhabdomyolyse sont les facteurs pronostiques prépondérants. La cohorte citée ci-dessus a permis l'établissement d'un score de survenue d'IRA après une rhabdomyolyse, rapporté dans la figure 30 [147].

Variable	Score
Age :	
50 – 70	1.5
70 - 80	2.5
> 80	3
Sexe féminin	1
Créatininémie initiale (mg/dL) :	
1.4 – 2.2	1.5
> 2.2	3
Calcémie (mg/dL) <7.5	2
CPK > 40 000 U/L	2
RM non liée à comitialité, syncope, exercice, statines ni myosite	3
Phosphatémie (mg/dL) :	
4 – 5.4	1.5
> 5.4	3
Bicarbonatémie < 19 mEq/L	2

Figure 30 : Score pronostique de la survenue d'une insuffisance rénale aiguë suite à une rhabdomyolyse.

D'après [147].

Dans cette étude, un patient se présentant avec un score inférieur à 5 présente un risque de recours à la dialyse et/ou mortalité s'élevant à 2,3%, alors que pour un patient se présentant avec un score supérieur à 10, ce risque passe à 61,2%. La survenue d'une IRA est un tournant évolutif péjoratif après rhabdomyolyse. En secteur de soins intensifs, la mortalité après rhabdomyolyse passe ainsi de 22% à 59% en présence d'une IRA [150, 151].

4.6 Pronostic rénal à long terme : l'inconnu

Les études de registre concernant le pronostic rénal des patients ayant eu une IRA après rhabdomyolyse sont rares. Un travail monocentrique réalisé sur 28 patients inclus sur une durée de 14 ans, fait état d'une survie de 80% et d'une récupération de la fonction rénale chez tous les patients, sans que la durée de suivi ne soit précisée[151]. Les cohortes de victimes de tremblements de terre sont nombreuses, mais ne rapportent pas d'autre information sur l'évolution que le statut vis-à-vis de la dialyse (sevré/non sevré) [152, 153]. Il est dit que « tous les survivants ont retrouvé une fonction rénale[154] », laquelle n'est malheureusement pas précisée.

Chez les transplantés rénaux, la survenue d'une rhabdomyolyse chez le donneur[155] ou le receveur (par exemple en cas d'hyperthermie maligne péri-opératoire[156]) s'accompagne d'un retard de reprise de fonction. A long terme, le pronostic semble favorable : dans une série de 4 patients, la créatininémie rapportée chez le patient au suivi le plus long (79 mois) est de 106 $\mu\text{mol/L}$ [157]. Un seul épisode de rhabdomyolyse de faible intensité ne semble donc pas grever le devenir des transplantés, à la réserve d'interprétation près que chez ces patients, les traitements anti-rejet pourraient moduler la survenue d'une MRC.

Classiquement, après résolution de la lyse musculaire, la fonction rénale récupère. Cependant, en l'absence d'évaluation clinique à distance, il paraît difficile d'écarter la possibilité qu'une MRC puisse survenir de manière retardée ou silencieuse après un épisode de rhabdomyolyse. La cinétique et la qualité de la récupération rénale sont inconnues :

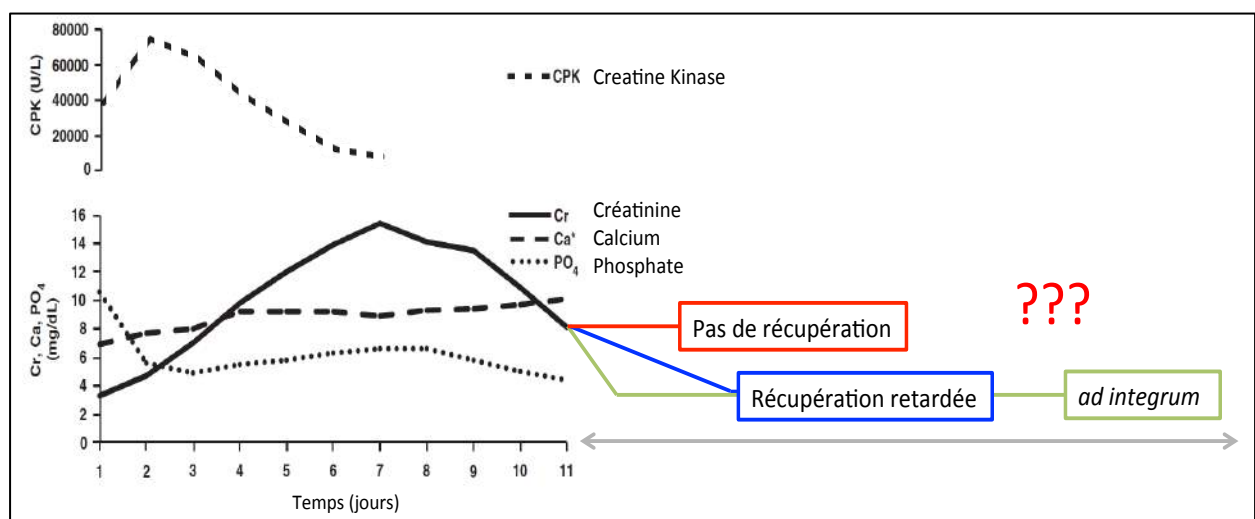


Figure 31 : Evolution clinique des principaux paramètres biologiques lors d'une rhabdomyolyse.

La fonction rénale récupère classiquement rapidement. Cependant, l'absence de suivi prolongé engendre une méconnaissance de la récupération à long terme. D'après[158].

Même si la proportion des patients en MRC secondaire à une affection musculaire est somme toute très faible (1 sur 1581 patients incidents d'après le registre REIN[11]), d'authentiques IRTT ont été rapportées chez des patients porteurs de myopathie[159]. La biopsie rénale d'un patient de 42 ans, porteur d'un syndrome de McArdle (trouble de la glycogénolyse musculaire), réalisée un mois après un épisode d'IRA requérant la dialyse, fait état d'une néphropathie tubulo-interstitielle chronique et de lésions de fibrose[160]. La rhabdomyolyse pourrait donc générer des lésions irréversibles, dont l'expression clinique serait variable en fonction du capital néphronique, et d'agressions surajoutées. Fait regrettable, les modèles expérimentaux de rhabdomyolyse n'ont jamais été utilisés au-delà de la période aiguë.

4.7 Physiopathologie

4.7.1 Apport des modèles murins

Si la rhabdomyolyse est parfois induite par compression mécanique[161], elle est le plus souvent déclenchée par une injection intramusculaire de glycérol pour reproduire la pathologie. Le glycérol provoque la lyse du compartiment musculaire par appel osmotique. Ce modèle, utilisé chez la souris et le rat depuis 1972[162], a permis de décrypter les mécanismes physiopathologiques impliqués dans cette atteinte rénale. Les mécanismes physiopathologiques rendant compte de l'apparition d'une IRA suite à une rhabdomyolyse ont été décrits à partir d'observations expérimentales, et peuvent être résumés ainsi :

4.7.2 Le *Primum movens* est la lésion musculaire

En condition physiologique, la concentration sarcoplasmique de calcium, minimale au repos, est strictement contrôlée pour n'autoriser des augmentations massives et ponctuelles qu'au moment du couplage excitation-contraction des fibres d'actine.

En condition pathologique, quelle que soit la cause de la rhabdomyolyse, le fonctionnement des pompes de calcium est perturbé par l'agression directe des sarcolemmes (en cas de phénomène mécanique) et/ou la déplétion en ATP secondaire à l'ischémie (en cas de phénomène vasculaire). L'afflux de calcium provoque la contraction permanente des fibres, une consommation d'énergie dérégulée et l'activation de protéases et phospholipases dépendantes du calcium[163]. La réaction de myolyse, une fois commencée, s'auto-entretient. Myofibrilles, cytosquelette et protéines membranaires se trouvent dégradés, digérés par les lysosomes, jusqu'à ce que le réseau myofibrillaire dans son ensemble se désintègre. Dans certains cas, la reperfusion du muscle après ischémie devient plus délétère que l'ischémie, notamment en ce qui concerne la production de ROS.

S'ajoutent à ces phénomènes des processus inflammatoires (infiltrat de neutrophiles) et des contraintes mécaniques : situé dans un compartiment anatomique inextensible, le muscle lésé gonfle, la pression augmente, et la perfusion diminue, aggravant l'ischémie (syndrome du compartiment)[142].

La figure 32 illustre les phénomènes mis en jeu dans le muscle.

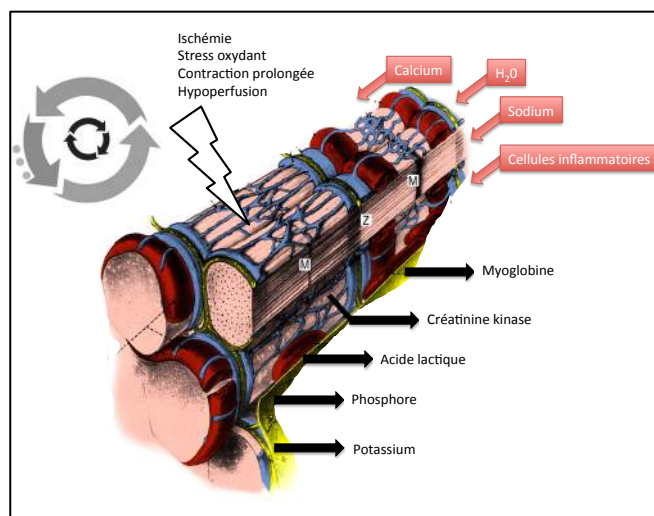


Figure 32 : Phénomènes initiaux lors d'une rhabdomyolyse.

L'ischémie ou le traumatisme direct affectent la régulation du calcium, induisant une contraction prolongée qui entretient l'ischémie. Les fibres musculaires lésées relarguent des toxiques dans la circulation. Le muscle est le siège d'une réabsorption d'eau qui entretient l'ischémie locale. Le phénomène de myolyse est auto-entretenu (cercle vicieux). D'après [142].

4.7.3 La lésion musculaire engendre des perturbations systémiques

La composition du plasma est modifiée par le relargage massif des débris musculaires dans la circulation sanguine. Tout d'abord, se constitue un « troisième secteur » dans la mesure où le muscle lésé est le siège d'une rétention hydrique (jusqu'à 10 L par membre), plaçant les patients dans une situation d'hypovolémie, de déshydratation extra-cellulaire. Ensuite, les acides organiques, provenant de la lyse des myocytes (en particulier l'acide lactique) provoquent une acidose à trou anionique élevé. Les nucléosides libres sont métabolisés en purines par le foie, et on note une augmentation de l'acide urique. A ceci s'associent une hypocalcémie, une hyperphosphorémie, et une hyperkaliémie. Cette dernière, fréquente et menaçante, nécessite une prise en charge immédiate et parfois le recours à une épuration extra-rénale.

4.7.4 Le rein se trouve en situation d'agression aiguë

4.7.4.1 La myoglobine, l'agent principal de la tubulopathie liée à la rhabdomyolyse

La myoglobine est une hémoprotéine cytoplasmique, exprimée uniquement dans les cardiomyocytes et les muscles squelettiques oxydatifs. Nommée « myoglobine » à cause de sa similitude avec la molécule d'hémoglobine, elle lie l'oxygène de manière réversible, facilite son transport depuis le globule rouge jusqu'à la mitochondrie et joue le rôle d'un réservoir d'oxygène en condition d'hypoxie ou d'anoxie. Libérée dans le plasma suite à la mort des myocytes, elle circule sous forme liée aux protéines. En

électrophorèse, elle migre entre les fractions de l' α -2 et de la β -globuline et partage des transporteurs communs avec l'hémoglobine. A des concentrations inférieures à la capacité de liaison maximale, 15 à 50% de la myoglobine est dans un état non lié[164]. Quand les concentrations de myoglobine dépassent la capacité de liaison maximale, la myoglobine libre, en excès, est filtrée dans le rein car son petit poids moléculaire (17,8 kDa) lui confère la propriété de passer au travers de la MBG (<65 kDa). Il est admis que, quand la concentration de myoglobine plasmatique dépasse 100 mg/dL, la myoglobinurie devient significative, de l'ordre de 0,5 à 1,5 mg/dL, et donne aux urines une teinte caractéristique. Nombre des effets délétères de cette hémoprotéine sont à relier à sa structure. Première protéine soumise à une étude de cristallographie aux rayons X, sa structure tertiaire est remarquable et représentée figure 33. La chaîne polypeptidique de 154 acides aminés forme 8 hélices α , entoure un résidu héminique central, qui peut lier l'oxygène, le monoxyde de carbone (CO) ou le NO[165]. L'atome de fer central, sous forme Fe^{2+} (ferreux) est nécessaire pour le transport de l'oxygène. Cependant, l'oxygène peut favoriser la transformation en fer Fe^{+3} (ferrique) générant un radical hydroxyle. Ci-dessous une vue schématique de la molécule de myoglobine :

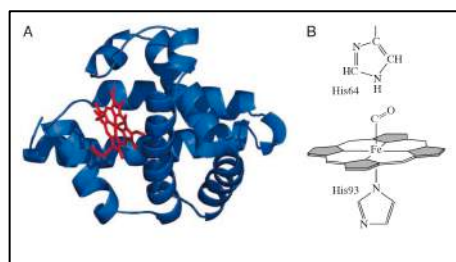


Figure 33 : Structure tridimensionnelle de la molécule de myoglobine.

D'après [165].

4.7.4.1.1 La myoglobine exerce une toxicité directe sur le tubule proximal

Plusieurs travaux expérimentaux indiquent qu'au contact de l'épithélium rénal, la myoglobine libre agit comme un toxique direct. Elle exerce une activité identique à celle d'une peroxydase, oxydant les biomolécules. Dans un modèle d'étude des segments tubulaires proximaux, la production de malondialdéhyde est significativement accrue dès 4 heures après l'injection de glycérol, témoignant d'un pouvoir de peroxydation lipidique transitoire et précoce de la myoglobine [166]. Sur les cellules épithéliales, la myoglobine exerce des effets combinés, à la fois antiprolifératifs et cytotoxiques, qui semblent dépendants du fer libre. Sont également observés : une diminution de la synthèse de l'ADN, des dommages directs de l'ADN, une réduction de la synthèse protéique et des dysfonctionnements de la chaîne respiratoire mitochondriale. Des cellules tubulaires rénales HK-2 exposées à la myoglobine montrent une moins bonne viabilité, indépendamment du fait que la charge protéique à résorber augmente (puisque dans les mêmes gammes de concentration, l'albumine n'est pas cytotoxique)[166, 167]. Enfin, la myoglobine est source d'isoprostanes et d'oxydation dérégulée des biomolécules[168].

4.7.4.1.2 La myoglobine forme des cylindres responsables de l'obstruction du tubule distal

Normalement réabsorbée par endocytose dans le tubule proximal, la myoglobine en excès s'accumule progressivement dans la lumière. Sa concentration urinaire augmente, phénomène favorisé par la déshydratation et la vasoconstriction rénale. La pression de filtration glomérulaire diminue, la réabsorption d'eau augmente, et la précipitation de la myoglobine avec l'uromoduline se trouve favorisée, d'autant plus que les facteurs classiques de génération de lithiase sont réunis pour favoriser les agrégats luminaux : l'acidose plasmatique diminue le pH, réduit la solubilité de l'acide urique, lui-même en excès par rapport aux conditions physiologiques[169]. De véritables cylindres sont observés dans la lumière tubulaire pendant la rhabdomyolyse[143]. L'obstruction tubulaire distale aggrave la stagnation de myoglobine au contact du tubule proximal, et entretient l'agression en amont. Les tubulocytes lésés se détachent dans la lumière, libérant des débris cellulaires, qui eux-mêmes accentuent la formation des cylindres.

4.7.4.1.3 La myoglobine entretient la vasoconstriction intra-rénale

L'hypoperfusion systémique entraîne la mise en jeu du système rénine-angiotensine-aldostérone, de la vasopressine et du système nerveux sympathique. Des substances vaso-actives aggravent la vasoconstriction rénale, à savoir l'endothéline-1, le thromboxane A2, TNF- α et le F2-isoprostane (produit de la peroxydation des acides gras essentiels). Comme indiqué précédemment, la myoglobine est un transporteur potentiel du NO. En chélatant le NO dans la circulation sanguine, elle participe à la vasoconstriction des artérioles médullaires et l'aggravation de l'ischémie tubulaire. La toxicité rénale de la myoglobine est résumée dans la figure 34:

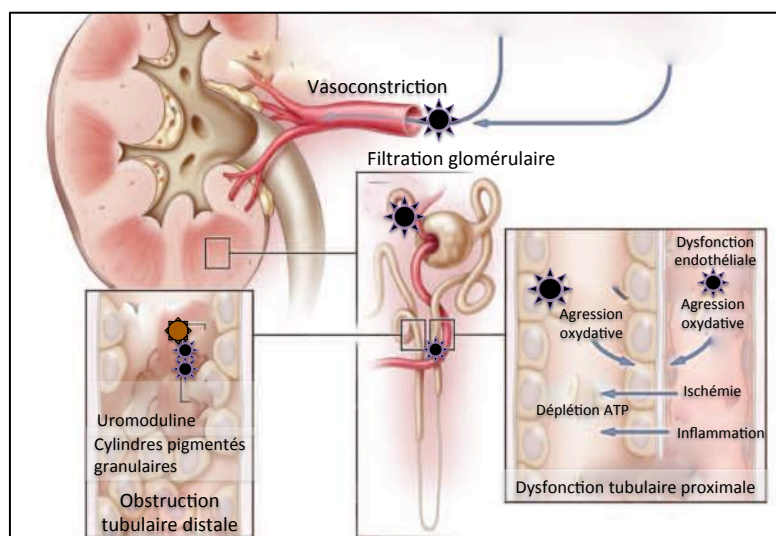


Figure 34: Néphrotoxicité de la myoglobine.

La myoglobine induit une vasoconstriction rénale, une dysfonction tubulaire proximale, et une obstruction tubulaire distale. D'après[145].

En réponse à ces agressions, des réponses protectrices se mettent en place, parmi lesquelles le système de l'hème-oxygénase est particulièrement étudié.

4.7.4.2 L'hème-oxygénase, système de protection

L'hème-oxygénase (HO) est une enzyme intra-cellulaire dégradant l'hème en biliverdine, fer libre divalent et monoxyde de carbone (CO) selon la réaction résumée dans la figure 35.

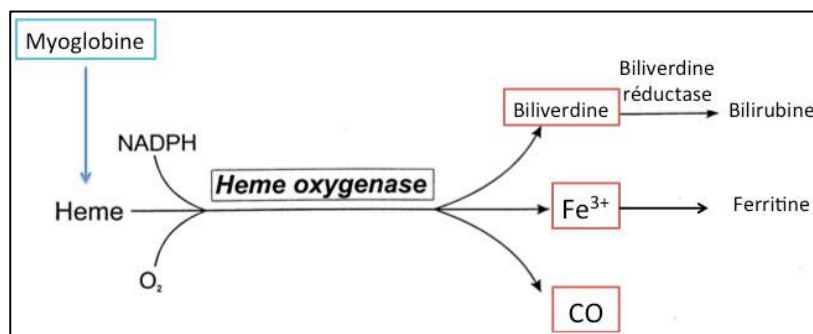


Figure 35: Dégradation de l'hème par l'enzyme Hème-oxygénase.

D'après[170].

Trois isoformes sont connues à ce jour. HO-3 correspond à un pseudo-gène. HO-2 est exprimée de manière constitutive, et est sur-exprimée en réponse aux glucocorticoïdes. HO-1 au contraire n'est pas exprimée de manière constitutive. Elle est inducible dans différentes conditions de stress cellulaire (ischémie, cytokines, endotoxines, oxydants, et substances vasoactives). HO-1 est surexprimée dans le rein dans de nombreuses situations physiopathologiques, et est très étudiée pour ses fonctions protectrices.

HO-1 neutralise les molécules d'hème et génère des produits vasorelaxants, anti-apoptotiques, et anti-inflammatoires (CO et pigments biliaires)[171]. Dans le contexte de rhabdomyolyse, l'induction d'HO-1 est excessivement rapide (dès 3 heures). De manière intéressante, un pré conditionnement d'animaux sauvages par de l'hémoglobine, favorisant l'expression d'HO-1, atténue les lésions [172]. A l'inverse, l'inactivation génétique d'HO-1 par génération d'animaux *knock-out* (KO), aggrave le pronostic en cas d'IRA liée à la rhabdomyolyse [173]. La surexpression d'HO-1 dans les Mø améliore les lésions I/R [174]. On note la présence d'atteintes mésangio-prolifératives glomérulaires chez un patient déficient en HO-1[175].

Fait remarquable, la protection médiée par HO-1 est perdue en l'absence de ferritine [176] : les souris KO pour la chaîne lourde de la ferritine dans le tubule proximal montrent des lésions plus sévères après rhabdomyolyse. En effet, la réaction catalysée par HO-1 est en soi une source de fer libre, donc potentiellement délétère (tel que cela était rapporté initialement sur tubule isolé *in vitro* [167]) si les systèmes de captation du fer libre ne coopèrent pas.

Enfin, l'expression de HO-1 est dépendante du facteur de transcription Nrf2 (*nuclear factor erythroid 2-related factor 2*). L'activation pharmacologique de Nrf2 par le sulforaphane (composé végétal organo-sulfuré, étudié pour ses vertus anti-cancéreuses et anti-microbiennes) conduirait à une protection cellulaire face à la myoglobine[177].

La physiopathologie de la tubulopathie liée à la rhabdomyolyse est donc partiellement élucidée. Les processus décrits ci-dessus sont interdépendants, et on comprend ainsi que cibler un mécanisme en particulier s'avère souvent insuffisant à bloquer complètement la survenue de l'IRA.

4.8 Prise en charge clinique actuelle

En matière de thérapeutique, la mesure principale est une réhydratation vigoureuse dès la situation de rhabdomyolyse identifiée. Les seules recommandations (résumées dans la figure 36) émanent de la *Renal Disaster Relief Task Force* de la Société Internationale de Néphrologie, récemment publiées dans le journal clinique américain de la société de Néphrologie[178].

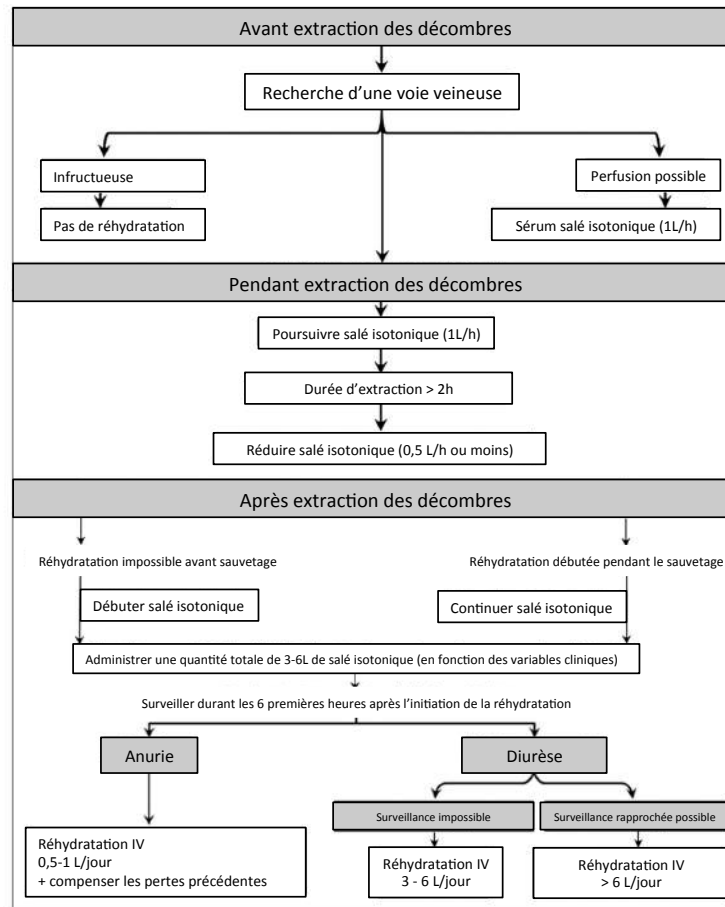


Figure 36: Recommandations thérapeutiques pour la prise en charge d'une rhabdomyolyse

D'après [178]. (cas de crush-syndrome lié à un séisme).

A la lecture de cet algorithme, la réhydratation par des cristalloïdes apparaît comme seul traitement efficace dans cette pathologie. L'utilisation de bicarbonates ou de mannitol n'est pas recommandée. Lutter contre l'hypovolémie permet de contrer l'hypoperfusion rénale, la mise en jeu des systèmes vasoconstricteurs, et restaure un flux dans le tubule urinaire exerçant un effet *wash-out* des cylindres, qui se forment d'autant moins que la diurèse est importante.

En marge de ce traitement à la fois symptomatique et préventif de la survenue d'une IRA lors d'une rhabdomyolyse, de nombreuses stratégies (médicamenteuses ou non) ayant un bénéfice théorique dans cette indication ont été publiées.

4.9 Stratégies thérapeutiques en développement

Les stratégies thérapeutiques en développement dans l'ARA ont été abordées dans le chapitre 1. Voici les éléments récents spécifiques à l'ARA succédant à une rhabdomyolyse.

4.9.1 Limiter le stress oxydant lié à la myoglobine

Dans le modèle de rhabdomyolyse induite par le glycérol, nombreux anti-oxydants au sens large se sont révélés bénéfiques: le glutathion (tripeptide anti-oxydant) [179], la N-acétyl cystéine (acide aminé non essentiel stimulant la production de glutathion) [180] [181], la glutamine (précurseur du glutathion) [182], la L-carnitine (impliquée dans la régénération du glutathion) [183], la L-citrulline (précurseur de la L-arginine, substrat de la NO synthase endothéliale (eNOS))[184], le carvedilol (beta-bloquant scavenger des radicaux libres) [185], les bioflavonoïdes [186] ou le resveratrol (anti-oxydants de la famille des polyphénols) [187], le pentobarbital (en augmentant l'activité de l'acide -aminobutyrique et en réduisant les activités NF-kB et iNOS) [188], le fasudil (inhibiteur de Rho-kinase, vasodilatateur) [189], le sérum salé enrichi en hydrogène (pour ses propriétés anti-oxydantes)[190], la suramine (anti-oxydant) [191] et l'acétaminophène (paracétamol)[192]. A noter une étude négative relatant l'inefficacité du sélénium[193].

4.9.2 Protéger les cellules rénales

Au-delà des stratégies de réduction du stress oxydant, plusieurs approches ont visé à promouvoir des voies de cytoprotection au sens large. Par exemple, l'administration d'EPO recombinante humaine à des rats soumis à une rhabdomyolyse atténue les lésions [194]. L'inhibition de l'apoptose *via* l'inhibition pharmacologique (i) des caspases (Z-VAD-FMK)[195] ou (ii) de la fission mitochondriale (inhibiteur de Drp-1)[196] se révèle également bénéfique. Plus avant-gardiste, l'administration intrarénale sous-capsulaire de facteurs de croissance (EGF) sous forme d'hydrogels a été récemment rapportée comme une stratégie prometteuse[197].

4.9.3 Administrer des agents réparateurs

Plusieurs études décrivent l'intérêt d'utiliser des MSC exogènes pour leurs potentiels trophique et immuno-modulateur. Leur sont attribués des effets mitogènes, anti-apoptotiques et anti-inflammatoires. Ces cellules, porteuses du CD44 (le ligand de l'acide hyaluronique) colonisent le tissu rénal agressé et favorisent sa réparation [198, 199]. L'injection de $3,5 \times 10^5$ cellules souches humaines isolées du liquide amniotique à des souris soumises à une rhabdomyolyse a été suivie des mêmes effets [200].

A ce jour, aucune de ces stratégies thérapeutiques n'a donné suite à une application directe chez les patients, d'une part car chaque développement se situe au stade fondamental expérimental, et d'autre part car l'argumentaire médical de la balance bénéfice-risque n'est pas en faveur d'essais cliniques dans cette entité nosologique. En effet, chez des patients dont l'évolution est classiquement favorable avec la seule réhydratation bien conduite, il est nécessaire de s'interroger sur la légitimité de proposer des traitements de ce type. Quoiqu'il en soit, ces données publiées augmentent les connaissances sur la pathologie, et concourent à proposer des pistes futures pour une meilleure prise en charge de l'IRA en général.

Tel que nous l'avons vu dans le chapitre 3, l'étude des Mø dans les néphropathies est incontournable, dans la mesure où ces cellules sont en première ligne, sensibles aux DAMPS, et peuvent orchestrer des réponses tant inflammatoires que réparatrices. Dans la tubulopathie liée à la rhabdomyolyse, les données sur l'implication du système immunitaire sont minces.

4.10 L'implication du système immunitaire

4.10.1 Présence de macrophages sur des biopsies humaines

Peu de biopsies sont réalisées dans le contexte clinique de rhabdomyolyse, puisque la situation pose peu de diagnostic différentiel, et puisque l'évolution après réhydratation est généralement rapidement favorable. Le risque représenté par une ponction biopsie rénale est souvent inférieur au bénéfice de la confirmation d'une tubulopathie liée à la rhabdomyolyse. L'analyse pronostique est souvent difficile en période aiguë, avant que les tubules n'aient pu régénérer.

Chez l'homme, des images de biopsie en contexte de rhabdomyolyse sont rapportées : dans l'article historique de Bywaters et Beall [143], chez un patient présentant une rhabdomyolyse secondaire à une infection par le virus de la dengue [201], et chez un patient présentant une rhabdomyolyse secondaire au paludisme. Dans ce dernier cas, les auteurs signalent la présence d'un infiltrat macrophagique sur la base de l'analyse d'une coloration à l'hématoxyline, mais aucun immuno-marquage n'est réalisé pour confirmer la nature immunologique de ces cellules [202].

4.10.2 Données expérimentales sur l'infiltrat macrophagique rénal

Chez l'animal, dans le modèle murin de rhabdomyolyse induite par le glycérol, des infiltrats significatifs de Mø et de lymphocytes T sont décrits en fonction du temps, en immuno-histochimie à l'aide des marqueurs ED1 pour les Mø et MS010P pour les lymphocytes [195]. Les valeurs moyennes publiées pour quatre à sept rats sont rapportées dans la figure 36.

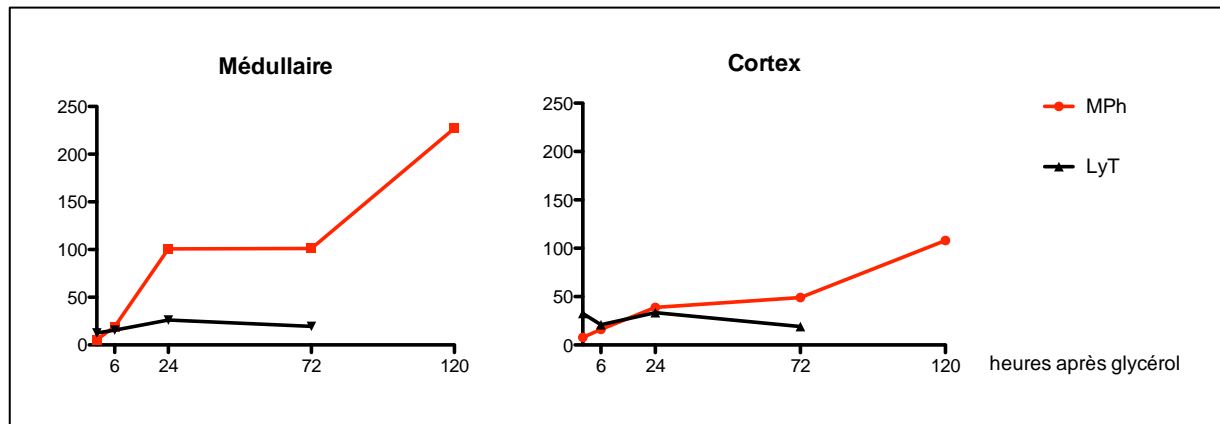


Figure 37: Infiltration de leucocytes dans le tissu rénal au cours de la rhabdomyolyse.

Cinétique décrite chez le rat pour les macrophages et les lymphocytes T en immunohistochimie, d'après Homsî, 2006.

Plus récemment, toujours chez le rat, un infiltrat de neutrophiles et de monocytes est noté 72 heures après glycérol, à l'aide d'un marquage naphthol AS-D chloroacetate esterase[191].

Enfin, un traitement par G-CSF confère une protection vis-à-vis des lésions induites par rhabdomyolyse [203]. On peut regretter que ni le rôle du G-CSF favorisant le recrutement de cellules immunitaires ni le mécanisme protecteur n'aient été abordés dans cette publication.

Il existe donc des arguments, à la fois théoriques et expérimentaux, pour suggérer que les Mø puissent être recrutés dans le rein lors d'une rhabdomyolyse. En 2006, Homsî écrivait que « la présence de Mø cinq jours après l'induction de la rhabdomyolyse suggère des changements dans leur état d'activation, passant d'un statut pro-inflammatoire précoce à un statut réparateur plus tardif ». A ce jour, aucune donnée n'est disponible sur le phénotype des Mø dans la rhabdomyolyse.

4.10.3 Hypothèses sur la polarisation des macrophages dans la rhabdomyolyse

Plusieurs arguments bibliographiques indiquent que les Mø observés pourraient aussi bien être anti-inflammatoires que pro-inflammatoires. En effet, l'exposition à la myoglobine peut favoriser théoriquement une polarisation vers M1 ou vers M2.

4.10.3.1 Une polarisation vers M2 grâce à l'hème

Tout d'abord, l'enzyme HO-1 exerce des activités d'immuno-modulation. L'étude des profils immunologiques des souris déficientes pour HO-1 a révélé une commutation des réponses cytokiniques vers T_{H1} , suggérant un état pro-inflammatoire global [204]. Les lymphocytes T sont capables d'exprimer HO-1 dans certaines conditions, sans que les conséquences fonctionnelles ne soient très claires. Quant aux DCs, l'expression d'HO-1 est impliquée dans leur processus de maturation et est nécessaire à l'induction de l'activité immuno-régulatrice vis-à-vis des lymphocytes T_{reg} [205]. En ce qui concerne les Mø, l'expression d'HO-1 orchestre une réponse anti-inflammatoire après exposition à l'hème. Comme illustré dans la figure 38, les Mø sont porteurs d'au minimum deux récepteurs de surface impliqués dans sa captation. Le CD163 capte l'hémoglobine (Hb) complexée à l'haptoglobine (Hp), et le CD91 capte l'hème libre complexé à l'hémopexine (Hx). Après endocytose, l'hème est transporté dans le cytosol par les transporteurs lysosomaux pour être dégradé par HO-1.

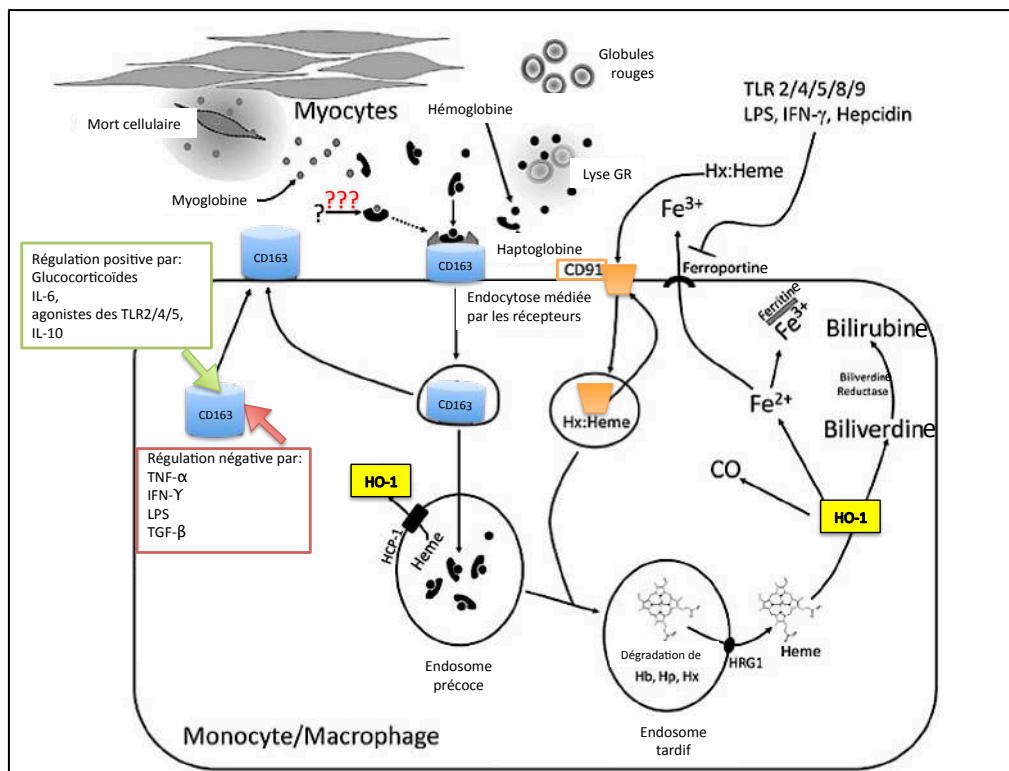


Figure 38: Expression de récepteurs captant l'hème à la surface des macrophages.

D'après [206]. Hb : hémoglobine ; Hp : haptoglobine ; Hx : hémopexine.

L'exposition de Mø à Hp:Hb entraîne une boucle de régulation positive avec surexpression du CD163, d'HO-1 et de manière intéressante la sécrétion d'IL-10[207]. La réponse du Mø à la captation de l'hème est donc globalement anti-inflammatoire. Les M1 expriment peu de CD163, contrairement aux M2 qui l'expriment fortement (CD163^{high})[208]. On s'attendrait ainsi à avoir une polarisation M2 en réponse à l'hème. *In vivo*, l'administration d'hémine, inducteur de l'hème, supprime le phénotype M1 et promeut le phénotype M2 dans un modèle de néphropathie diabétique type 1 induite par la streptozotocine[209]. Une réserve à l'extrapolation de ces résultats au contexte de rhabdomyolyse est représentée par le fait que ces données sont obtenues avec l'hémoglobine, et non la myoglobine, ce d'autant que les mécanismes de clairance de la myoglobine intacte (avant libération de l'hème) n'ont pas encore été étudiés.

Dans un travail consacré à l'étude de l'effet bénéfique de MSC, il est rapporté que la protection est médiée par l'augmentation de Mø M2. Malheureusement, le phénotype des Mø du rein au cours de la rhabdomyolyse en l'absence de MSC n'est pas décrit[210].

4.10.3.2 Une polarisation vers M1 via la myoglobine, un DAMPS

Comme rappelé dans le chapitre 1, les Mø sont sensibles aux agressions tissulaires et détectent, via leurs TLRs, la présence de DAMPS. L'agression des cellules épithéliales par la myoglobine et la présence de cylindres (myoglobine-uromoduline) sont des candidats théoriques à la mise en jeu de la voie de l'inflammasome (Nlrp3) dans les Mø. L'étude de Mulay et al [211] rapporte, dans les DCs, l'activation de Nlrp3 par les cristaux d'oxalate de calcium. De tels mécanismes pourraient être mis en jeu avec les cylindres de myoglobine.

En outre, la myoglobine, en chélatant le NO, diminue l'activité immunosuppressive de Mø activés par l'IFN- γ [212]. La stimulation de lignées de Mø par le LPS déclenche une production de NO par iNOS. Cette activité est augmentée par l'hémoglobine et la myoglobine.[213]

Un argument expérimental en faveur d'une polarisation de Mø inflammatoires est l'effet bénéfique du montelukast, un antagoniste du cysteinyl leukotriene receptor 1 montré *in vivo* (exprimé par les Mø)[214].

D'après Anders et al [41], les cristaux intra-tubulaires activent l'inflammasome dans les cellules dendritiques, comme représenté figure 39.

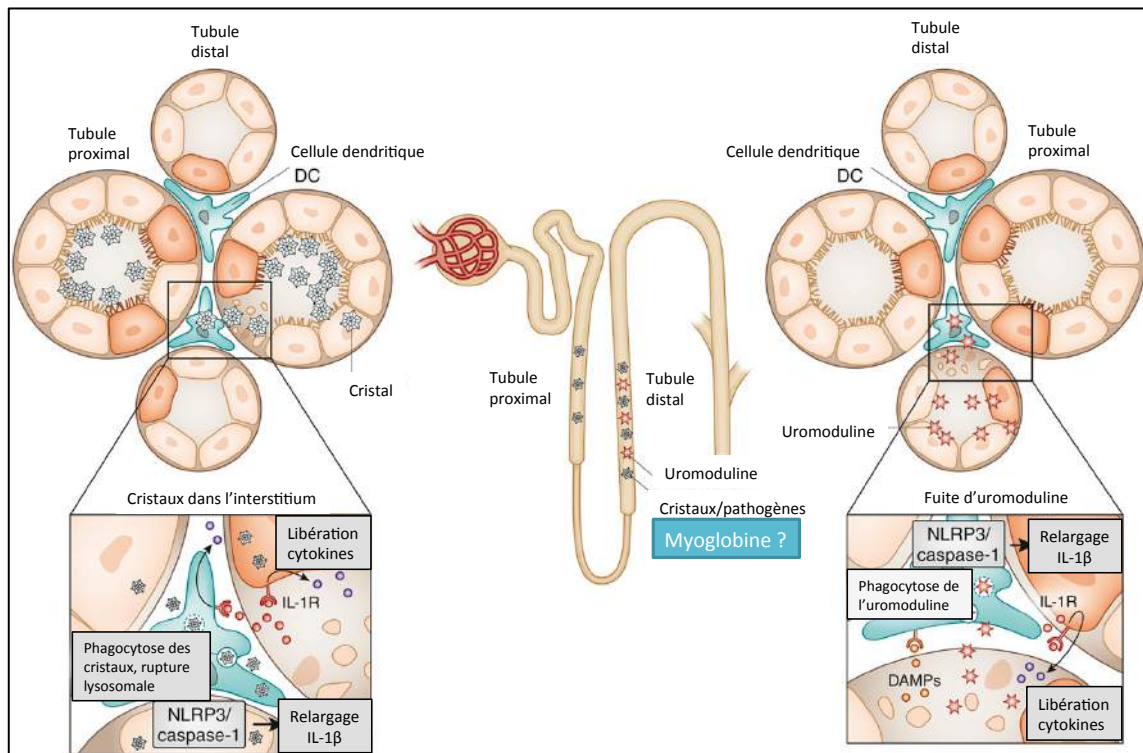


Figure 39: Activation de l'inflammasome dans les cellules dendritiques par des cristaux intra-tubulaires.

D'après [41]

Par extrapolation, la myoglobine, qui elle aussi se lie à l'uromoduline, pourrait déclencher la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par les Mø. On s'attendrait donc à avoir une polarisation M1 en réponse à la myoglobine.

Conclusion

La rhabdomyolyse est donc une situation d'ARA dans laquelle le système des Mø pourrait être impliqué, et jouer un rôle bénéfique ou délétère selon l'état de polarisation. Parmi les néphropathies, la tubulopathie post-rhabdomyolyse a été très peu étudiée sous l'angle immunologique. Les raisons en étaient probablement :

- un faible poids en matière de santé publique (par comparaison à la néphropathie diabétique par exemple)
- une histoire naturelle paraissant limpide, impliquant la myoglobine en tant qu'agent néphrotoxique
- une évolution clinique peu problématique, qui caricaturalement se résume à : soit le décès par hyperkaliémie dans des circonstances de catastrophe naturelle, soit la récupération totale dans des circonstances (e.g. iatrogènes ou de traumatisme mineur) où la réhydratation a été engagée de manière précoce.

Jusqu'à présent, les questions suivantes n'avaient jamais été abordées :

- Les Mø sont-ils impliqués dans les lésions rénales après rhabdomyolyse ? Si oui, quel est leur phénotype ?
- La rhabdomyolyse, en tant que situation d'ARA, peut-elle générer des séquelles fibrotiques et évoluer vers la MRC ?

5. Travail personnel

5.1 Introduction

Nous avons vu l'importance des phénomènes inflammatoires dans les situations d'agression rénale aiguë (ARA) et chronique (fibrogénèse), même si la néphropathie initiale n'est pas d'origine immune. Parmi les cellules du système immunitaire inné, nous avons décrit le système des phagocytes mononucléés (monocytes, DCs et Mø) et souligné la plasticité de ces derniers en matière de phénotype. Les Mø du tissu rénal comportent un ensemble de cellules très hétérogènes, tantôt inflammatoires, tantôt cicatricielles ou fibrosantes. Leur caractérisation peut s'appuyer sur le concept de polarisation vers M1 (classiquement activés) ou M2 (alternativement activés) sans pour autant s'y cantonner, dans la mesure où le contexte tissulaire dans lequel évoluent ces cellules détermine leur état d'activation. Nous avons choisi de nous intéresser à la polarisation des Mø dans la situation d'ARA secondaire à une rhabdomyolyse car, même si les Mø avaient été observés dans le rein chez l'animal, aucune donnée n'était disponible sur leur rôle.

Nous avons pu observer sur une biopsie rénale d'un patient admis pour ARA suite à une rhabdomyolyse d'origine toxique un infiltrat significatif de Mø, typés à l'aide du CD68. Puis nous avons utilisé le modèle murin de rhabdomyolyse induite par le glycérol, afin de mieux décrypter la fonction biologique de ces cellules. Nous avons confirmé que les Mø étaient retrouvés dans le rein chez la souris, et que leur phénotype n'était pas constant au cours de l'évolution de la pathologie. Par analyse des marqueurs membranaires en cytométrie en flux, sur des suspensions cellulaires dérivées de reins ayant subi une digestion enzymatique, nous avons pu établir qu'en situation d'homéostasie, les Mø étaient de type R2 (F4/80^{hi}CD11b⁺). Après la rhabdomyolyse, on notait une recrudescence de Mø en majorité de type R1 (F4/80^{lo}CD11b^{hi}) à J2, alors qu'à J8, le phénotype dominant était de nouveau de type R2 (F4/80^{hi}CD11b⁺), mais avec un enrichissement en CD206 (marqueur de réparation, Mø M2). Nous avons tenté de comprendre les phénomènes de modification de phénotype des Mø en utilisant un modèle *in vitro*, dans lequel des cellules épithéliales rénales ou des Mø primaires étaient soumis à l'action de la myoglobine. Nous avons observé que les cellules rénales exprimaient des cytokines de recrutement des Mø après exposition à la myoglobine, et une polarisation « mixte » des Mø, caractérisée par l'expression de marqueurs M1 et M2. A ce stade, nous ne pouvions pas distinguer si la population des Mø contenait : soit deux contingents cellulaires, M1 et M2, soit un seul contingent cellulaire de Mø exprimant simultanément les marqueurs M1 et M2.

Nous avons donc réalisé une étude transcriptionnelle à l'échelle de la cellule isolée, et non de la population, *in vivo*, sur des Mø R1 et R2 de rein contrôle ou après rhabdomyolyse. Nous avons pu

authentifier que la rhabdomyolyse était une situation d'inflammation rénale, avec une activation du système macrophagique (R1 et R2), et que les deux types cellulaires R1 et R2 avaient des caractéristiques bien distinctes : alors que les R1 exprimaient des cibles de l'inflammation et des marqueurs M2 dont la fibronectine, les R2 exprimaient des cibles de réparation et d'inflammation suggérant un phénotype M2b. Nous n'avons pas pu résumer que les R1 étaient des M1 et les R2 étaient des M2, mais nous avons démontré par des études de co-expression que des Mø pouvaient simultanément transcrire des cibles a priori opposées, et donc se trouvaient au moment de l'étude dans un état d'activation mixte.

Enfin, pour valider ces résultats et explorer la signification biologique de ces populations, nous avons mis en place des protocoles de déplétion macrophagique en utilisant le clodronate liposomal (CL). La déplétion des Mø par le CL a permis de prévenir la mortalité liée à la rhabdomyolyse chez les souris, réduire leur atteinte rénale en matière de structure et de fonction. Le traitement précoce par CL réduisait de manière significative la population R1, et s'accompagnait d'une réduction secondaire de la production de cytokines pro-inflammatoires (CCL2, CCL7) et de composants de la matrice extracellulaire (fibronectine, collagène). A long terme, un et sept mois après rhabdomyolyse, nous avons observé des séquelles chroniques de l'ARA, ce qui n'avait jamais été évoqué. Le fait de réduire l'inflammation initiale avec le CL s'est révélé bénéfique.

Nous avons donc proposé un schéma physio-pathologique dans lequel les Mø pro-inflammatoires de type R1 participent aux lésions rénales induites par une rhabdomyolyse et aggravent le pronostic à long terme.

5.2 Manuscrit

Ce travail a donné lieu à deux communications orales :

« An example of C1 application in Toulouse: Kidney macrophages » Belliere et al.
European Single-Cell User Meeting, 3-4 décembre 2013, Cambridge.

« Single-cell transcriptional analysis of FACS-sorted kidney macrophages » Belliere et al.
International symposium on Microgenomics, 15-16 mai 2014, Paris.

Ce travail a été accepté le 29/07/2014 pour publication dans le « Journal of the American Society of Nephrology ».

Specific Macrophage Subtypes Influence the Progression of Rhabdomyolysis-Induced Kidney Injury

Julie Belliere,^{*††} Audrey Casemayou,^{*†} Laure Ducasse,^{*†} Alexia Zakaroff-Girard,[§] Frédéric Martins,^{||} Jason S. Iacovoni,[¶] Céline Guilbeau-Frugier,^{†**} Bénédicte Buffin-Meyer,^{*†} Bernard Pipy,^{††} Dominique Chauveau,^{*††} Joost P. Schanstra,^{*†} and Jean-Loup Bascands^{*†}

^{*}Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), U1048, Institute of Cardiovascular and Metabolic Diseases, Toulouse, France; [†]Université de Toulouse III Paul Sabatier, Toulouse, France; [‡]Department of Nephrology and Organ Transplantation, Centre Hospitalier Universitaire Rangueil, Toulouse, France; [§]Cytometry and Cell-sorting Platform, INSERM/Unité Mixte de Recherche U1048, Toulouse, France; ^{||}Genome and Transcriptome Platform, Toulouse Genopole INSERM/Unité Mixte de Recherche U1048, University Paul Sabatier, Toulouse, France; [¶]Bioinformatic Platform, INSERM/Unité Mixte de Recherche U1048, University Paul Sabatier, Toulouse, France; ^{**}Department of Pathology, Toulouse University Hospital, Rangueil, Toulouse, France; and ^{††}Unité Mixte de Recherche 152, Macrophages Polarization and Nuclear Receptors, Toulouse, France

ABSTRACT

Rhabdomyolysis can be life threatening if complicated by AKI. Macrophage infiltration has been observed in rat kidneys after glycerol-induced rhabdomyolysis, but the role of macrophages in rhabdomyolysis-induced AKI remains unknown. Here, in a patient diagnosed with rhabdomyolysis, we detected substantial macrophage infiltration in the kidney. In a mouse model of rhabdomyolysis-induced AKI, diverse renal macrophage phenotypes were observed depending on the stage of the disease. Two days after rhabdomyolysis, F4/80^{low}CD11b^{high}Ly6b^{high}CD206^{low} kidney macrophages were dominant, whereas by day 8, F4/80^{high}CD11b⁺Ly6b^{low}CD206^{high} cells became the most abundant. Single-cell gene expression analyses of FACS-sorted macrophages revealed that these subpopulations were heterogeneous and that individual cells simultaneously expressed both M1 and M2 markers. Liposomal clodronate-mediated macrophage depletion significantly reduced the early infiltration of F4/80^{low}CD11b^{high}Ly6b^{high}CD206^{low} macrophages. Furthermore, transcriptionally regulated targets potentially involved in disease progression, including fibronectin, collagen III, and chemoattractants that were identified *via* single-cell analysis, were verified as macrophage-dependent *in situ*. *In vitro*, myoglobin treatment induced proximal tubular cells to secrete chemoattractants and macrophages to express proinflammatory markers. At day 30, liposomal clodronate-mediated macrophage depletion reduced fibrosis and improved both kidney repair and mouse survival. Seven months after rhabdomyolysis, histologic lesions were still present but were substantially reduced with prior depletion of macrophages. These results suggest an important role for macrophages in rhabdomyolysis-induced AKI progression and advocate the utility of long-term follow-up for patients with this disease.

J Am Soc Nephrol 26: ●●●–●●●, 2014. doi: 10.1681/ASN.2014040320

Severe damage of skeletal muscle, or rhabdomyolysis, is the second most common cause of death seen after an earthquake. AKI is a life-threatening complication of rhabdomyolysis. Rhabdomyolysis-induced AKI represents 10% of all AKI cases.¹ Histologic data in this context are extremely scarce. Experimental evidence indicates that myoglobin (released from injured muscles) exerts its deleterious effects in part through a direct mechanism on proximal tubular cells involving peroxidase-like activity and

Received April 1, 2014. Accepted July 29, 2014.

Published online ahead of print. Publication date available at www.jasn.org.

Correspondence: Dr. Jean-Loup Bascands or Dr. Joost P. Schanstra, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), U1048, Institute of Cardiovascular and Metabolic Diseases, 1 avenue Jean Poulhès, BP 84225, 31432 Toulouse Cedex 4, France. Email: jean-loup.bascands@inserm.fr or joost-peter.schanstra@inserm.fr.

Copyright © 2014 by the American Society of Nephrology

deleterious iron release,² and by an indirect mechanism involving the obstruction of the distal tubule by casts resulting from the interaction between myoglobin and uromodulin.³ Furthermore, myoglobin disturbs renal microcirculation, which is decreased because of the hypovolemia.⁴ AKI is then further worsened *via* hypoxia-related mechanisms.⁵ It is now acknowledged that inflammation plays a major role in the development of ischemic AKI,⁶ but the possibility that rhabdomyolysis-induced AKI could be an inflammatory disease has not yet been proposed.

While macrophage infiltration has been reported in a rat glycerol-induced AKI model⁷ and in a kidney biopsy specimen from a patient with rhabdomyolysis,⁸ the role or phenotype of the macrophages remains to be determined in rhabdomyolysis-induced AKI. Macrophages have long been recognized to be heterogeneous. While M1 macrophages are proinflammatory, classically activated macrophages, M2 macrophages are associated with immunoregulatory and tissue-remodeling functions. *In vivo* studies suggest that the phenotype of macrophages is changing over time, in response to both the microenvironment and the stage of the disease.^{9,10} Mononuclear cell depletion was associated with the exacerbation of kidney lesions induced by cisplatin or acute GN, suggesting a protective role for these cells.^{11,12} Conversely, macrophage depletion was associated with the reduction of lesions in obstructive nephropathy¹³ and ischemic AKI,¹⁴ suggesting that macrophages exacerbate AKI. Taken together, depletion experiments in AKI have led to conflicting data and demonstrate the need of additional studies to define macrophage subtypes.¹⁵

It is well recognized that AKI is a risk factor for the development of CKD in humans¹⁶ and that the damaged tubule plays a role in the pathogenesis of CKD in mice.¹⁷ The severity of AKI is correlated to the rate of progression to CKD.¹⁸ Furthermore, recent studies showed that the macrophage phenotype controls long-term AKI outcome.^{19,20} In rhabdomyolysis-induced AKI, while injury is transient and associated with a favorable outcome,²¹ the effect on long-term renal function has not yet been studied. Of note, relapsing rhabdomyolysis may lead to CKD.²² This study was undertaken to evaluate the role of macrophages in rhabdomyolysis-induced AKI and subsequent CKD.

RESULTS

Evidence of Macrophage Infiltration into the Kidney during Rhabdomyolysis-Induced AKI

In a 35-year-old patient, admitted for severe drug-induced rhabdomyolysis requiring dialysis (Figure 1A), a kidney biopsy revealed tubular necrosis and casts (Figure 1B). Compared with the limited presence of CD68⁺ macrophages in a control kidney (Figure 1C, left), macrophages were abundant in kidney tissue and within the tubular lumen (Figure 1C right, D). To better understand the role and nature of the infiltrate, we used a murine model of rhabdomyolysis-induced AKI relying

upon intramuscular glycerol injection. Two days after glycerol administration, we observed high mortality (Figure 1E) and severe AKI as indicated by increased BUN concentrations (Figure 1F). We confirmed kidney macrophage infiltration in mice using immunohistochemistry and flow cytometry (Figure 1, G and H, Supplemental Figure 1A).

Proximal Tubular Cells Might Participate in Macrophage Recruitment after Exposure to Myoglobin

Filtrated myoglobin first contacts the renal proximal tubule. To evaluate potential involvement of the myoglobin-exposed proximal tubule in macrophage recruitment, we treated a mouse proximal tubule cell line (MCT) with myoglobin. Treatment induced the expression of the positive control heme oxygenase (*Hmox1*), a critical enzyme for myoglobin degradation and detoxification (Figure 2A). In the presence of myoglobin, MCT expressed significantly more of the proinflammatory cytokines *Ccl2* and *Ccl7* (Chemokine [C-C motif] ligand) at mRNA level (Figure 2A) and secreted more CCL7 protein in the supernatant (Figure 2B). This suggested that proximal tubular cells participate in macrophage recruitment upon exposure to myoglobin.

Rhabdomyolysis Drastically Affects the Kidney Macrophage Phenotype

It is known that specific macrophage subtypes contribute to kidney injury (M1) and repair (M2) in ischemia-reperfusion.²³ In our model, kidney function was altered at day 2 and not yet fully restored at day 8 in surviving animals (Figure 3A), suggesting that repair was still ongoing at this stage. We discriminated three monocyte/macrophage populations according to the expression levels of CD11b and F4/80 (Figure 3B): F4/80[−]CD11b⁺ (R0), F4/80^{low}CD11b^{high} (R1), and F4/80^{high}CD11b⁺ (R2). Ly6b is a marker known to be absent on resident macrophages. We analyzed Ly6b and F4/80 expression gradually from R0 to R2 and observed that their inverse expression pattern was uninterrupted and progressive (Supplemental Figure 1B), suggesting that R2 cells corresponded to mature resident macrophages.

Under normal conditions (day 0) and consistent with previous data,^{24,25} the R2 macrophage fraction represented the majority and encompassed an M2-like contingent (CD206^{high}, CD36^{high}) (Figure 3, D and F, Supplemental Figure 1, C–E).

At day 2, R1 macrophages became the dominant subtype (Figure 3C), likely corresponding to inflammatory macrophages, derived from monocytes and possessing an M1-like contingent, without M2 markers (CD206^{low}, CD36^{low}, Ly6b^{high}, Ly6g^{low}, CD209^{high}). The percentage of Ly6b⁺ cells were significantly increased when examined within each macrophage type individually ($P < 0.001$) (data not shown).

By the repair phase (day 8), R2 macrophages accounted for the majority again. The M2 markers (CD206 and CD36) increased at this time point (Supplemental Figure 2, A and B). R0 cells seemed to correspond to other myeloid cells (CD206[−], CD36[−], Ly6b^{very high}, Ly6g^{high}, CD209^{low}).

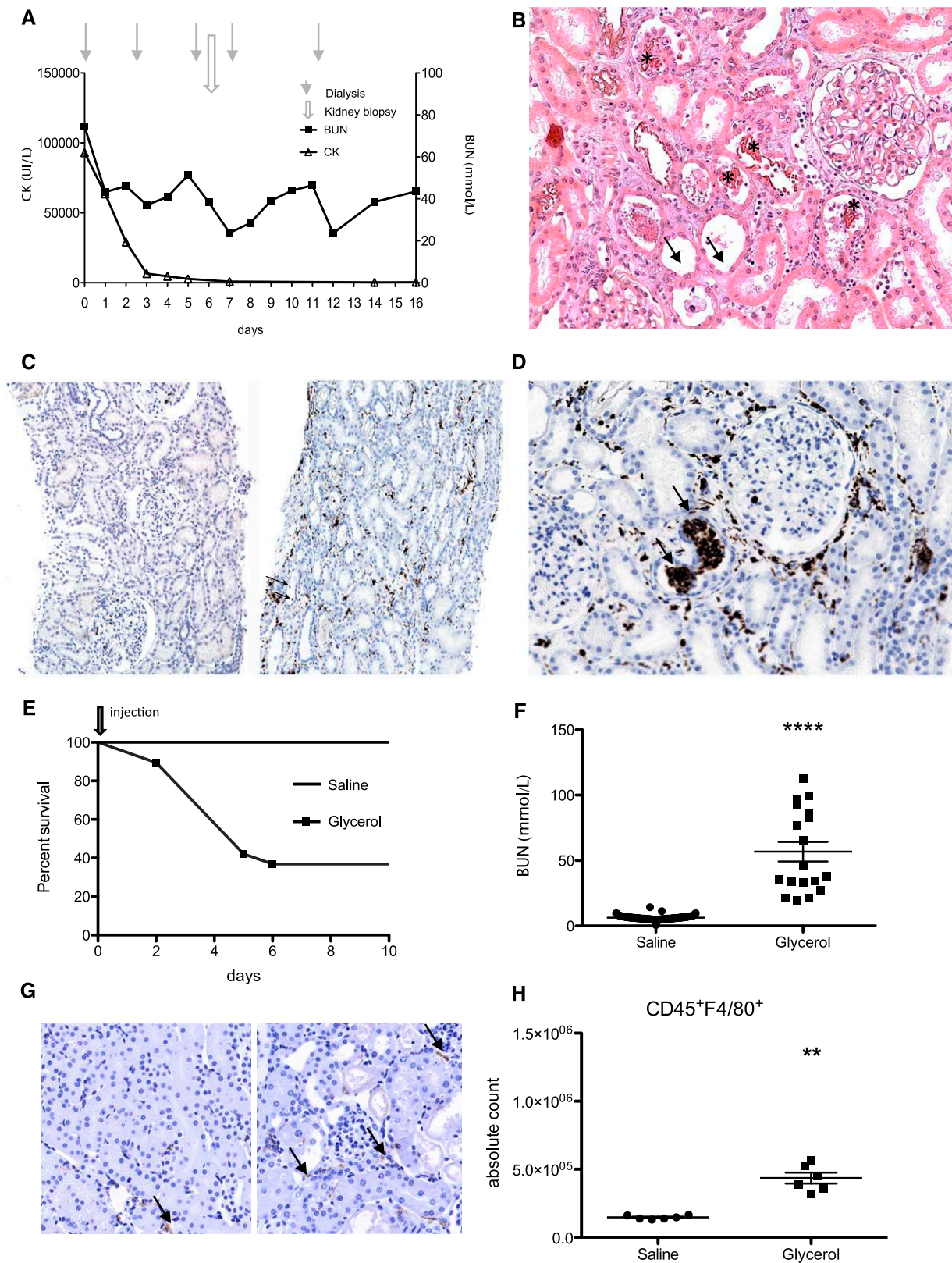


Figure 1. Rhabdomyolysis leads to macrophages recruitment in both human and mouse kidneys. (A) A 35-year-old patient was admitted for severe rhabdomyolysis. BUN and creatine kinase (CK) serum levels are reported (normal BUN, 2.5–7 mmol/L; CK, <170 IU/L). After 6 days the patient was anuric and a kidney biopsy was performed. (B) Hematoxylin-eosin staining of a kidney section (original

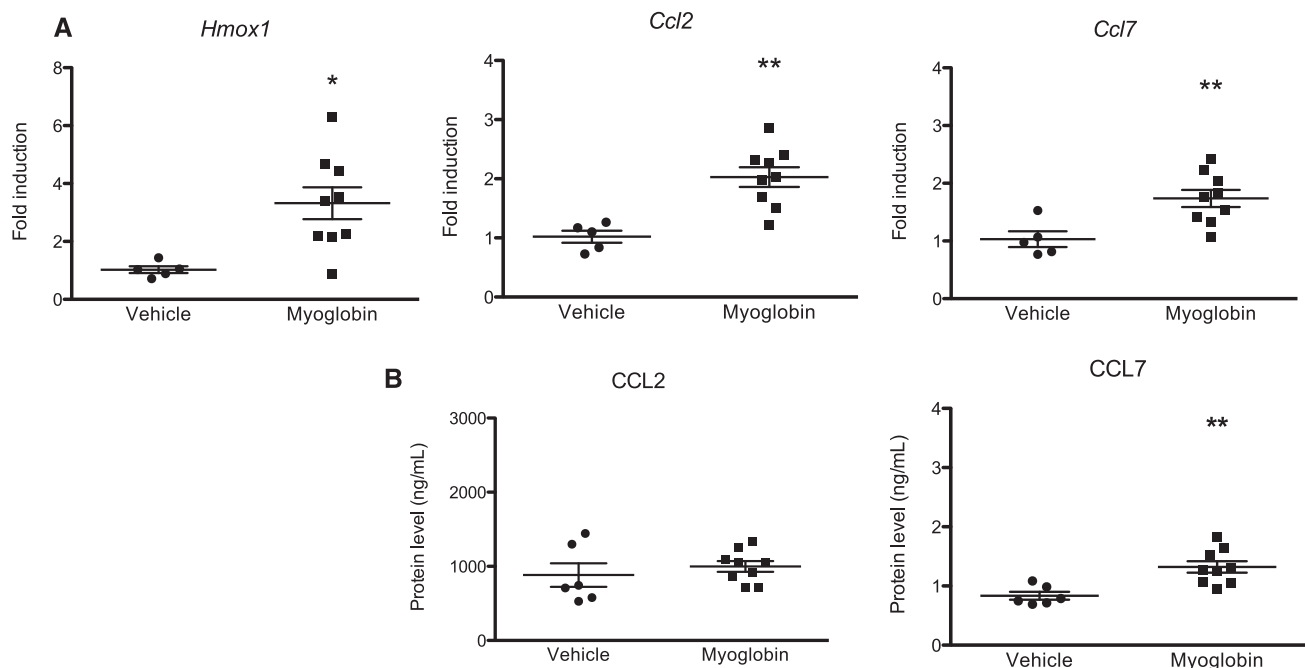


Figure 2. Myoglobin treatment of proximal tubular cells induces secretion of CCL-7 chemokine. Murine proximal tubular epithelial cells were treated or not with 50 μ M myoglobin for 48 hours. (A) Relative mRNA expression levels of *Hmox1* and macrophage-recruiting chemokines *Ccl2* and *Ccl7*. (B) Culture supernatants were analyzed for the corresponding chemokine proteins ($n=5-9$; * $P<0.05$; ** $P<0.01$). Lines display means \pm SEM. Black circles and squares display individual data in the vehicle and myoglobin groups, respectively.

Myoglobin Polarizes Macrophages Simultaneously Toward M1 and M2 Phenotypes *In Vitro*

The modification of the macrophage phenotype during rhabdomyolysis-induced AKI raises the question as to whether myoglobin can polarize macrophages. Primary macrophages, FACS-sorted from control kidneys (CD11b⁺F4/80⁺ fraction), and peritoneal macrophages were stimulated with myoglobin (Figure 4). In both macrophage subtypes, myoglobin induced significant upregulation of *Hmox1*, *Ccl2*, M1 activation marker *Il1b* and M2 activation marker *CD206*. However, in peritoneal macrophages, the effects of myoglobin were clearly dose-dependent and included an increase in the expression of *Ccl7* and *Nlrp3* (inflammasome transcription factor). The specificity of myoglobin-induced changes in target expression was validated by treatment with IL-4 or IFN γ +LPS (Supplemental Figures 3 and 4). Our data clearly show the concomitant expression of both M1- and M2-type markers, suggesting the coexistence of different macrophage subsets or a high

plasticity potential whereby macrophages can simultaneously express both types of markers. To solve this question we evaluated gene expression at the single-cell level in kidney macrophages.

Single-Cell Transcriptional Analysis of R1 and R2 Macrophages *In Vivo*

Cells were sorted according to F4/80 and CD11b expression and loaded into a C1 single-cell device, in order to obtain cDNA from a known single-cell. Next, quantitative PCR-based gene expression profiling was performed for 96 genes using 22–48 cells for each condition (Figure 5A, Supplemental Figure 5, A and B). For some genes, including housekeeping genes (*Gapdh*, *Ppia*), the distribution of expression (Log₂Ex) values was unimodal. Conversely, most of the genes exhibited heterogeneous multimodal expression (e.g., F4/80 and CD11b in Figure 5B). Some genes were upregulated in the glycerol condition irrespective of R1/R2 status (Figure 5C). Violine plots

magnification, $\times 200$) revealed casts (*) and the loss of the proximal tubule brush border (arrows). (C) Anti-CD68 staining revealed macrophages in kidney sections from a control patient (left) and in the patient with rhabdomyolysis (right) (original magnification, $\times 100$) or at $\times 200$ magnification (D). Arrows indicate macrophages located within the tubular lumen (C and D). (E) C57Bl/6 mice (males, 8–10 weeks old) were injected with saline ($n=6$) or 7.5 ml/kg 50% glycerol ($n=20$) in the thigh caudal muscles. Significant mortality was observed in the glycerol-treated group ($P<0.05$). (F) BUN was elevated 2 days after glycerol injection ($n=18$; **** $P<0.0001$). (G) Control (left image) and glycerol-treated mice (right image) kidney sections revealed an increase in F4/80 macrophages (arrows; original magnification, $\times 400$). (H) Flow cytometry analysis of kidney CD45⁺F4/80⁺ cells based on absolute cell counts revealed an increase in the kidney macrophage number as well ($n=6$; ** $P<0.01$).

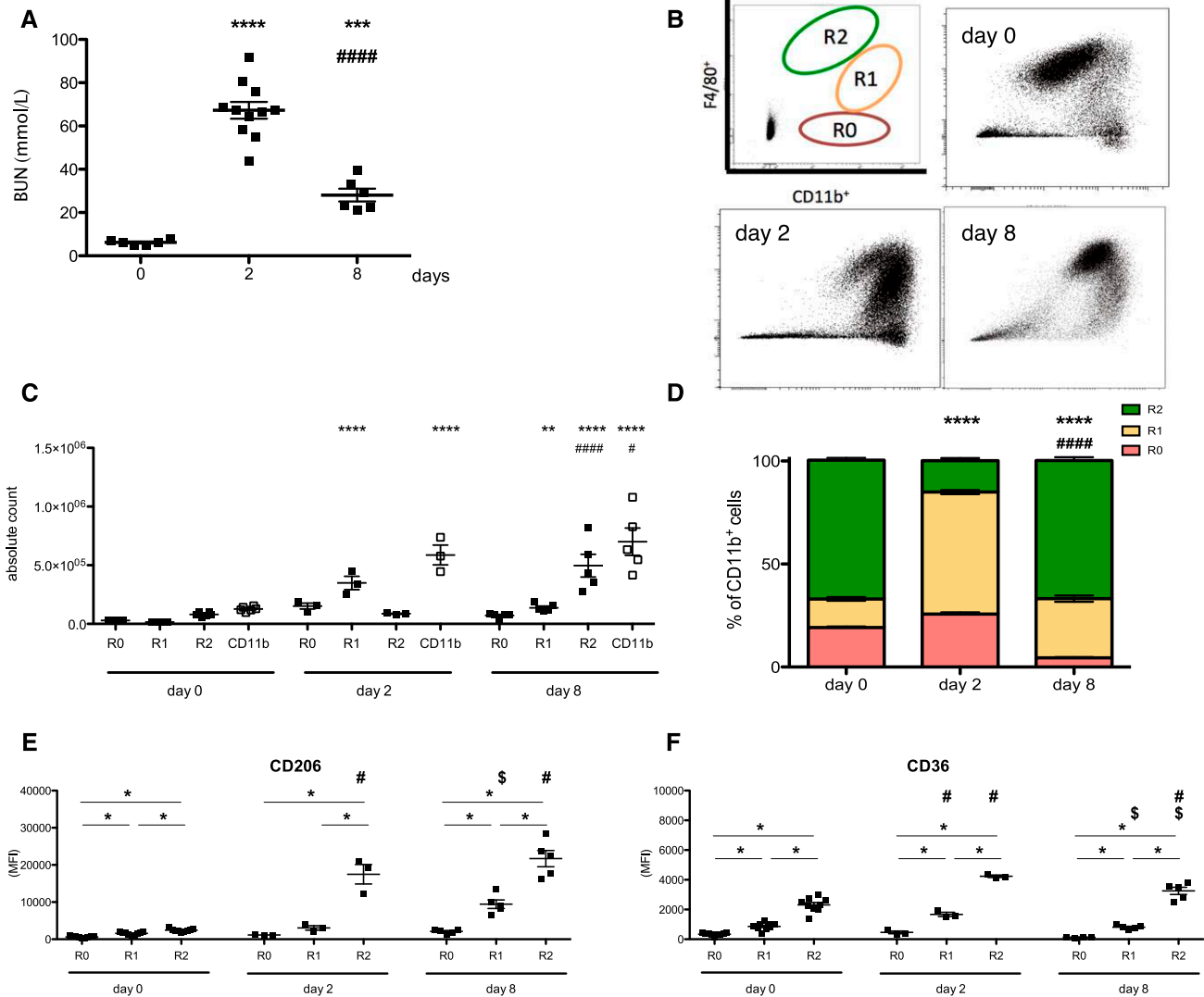


Figure 3. The kidney macrophage subtype evolution mirrors kidney function. (A) The elevated BUN levels observed at day 2 (Figure 1F) decreased by day 8, indicating ongoing kidney repair ($n=6-11$). (B–D) Analysis of macrophages obtained from kidney cell suspensions. Three regions were discriminated according to the expression levels of CD11b and F4/80 as follows: F4/80^{CD11b}⁺ (R0), F4/80^{low}CD11b^{high} (R1), and F4/80^{high}CD11b⁺ (R2). CD11b corresponds to R0+R1+R2 sum. Macrophage distribution among the three regions was affected by glycerol injection at day 2 and day 8. (B) Representative dotplot gated on 30,000 live CD45⁺ cells. (C) R0, R1, R2, and total CD11b⁺ cell counts in kidney samples ($n=3-5$; ** $P<0.01$ and *** $P<0.001$ compared with day 0; # $P<0.05$ and #### $P<0.0001$ compared with day 2). (D) Distribution of CD11b⁺ cells in the three regions ($n=3-5$). Macrophage subpopulations were characterized by expression of surface markers using flow cytometry. Mean fluorescence intensity (MFI) is reported on the yaxis for the following markers: (E) CD206 (M2 marker) and (F) CD36 (M2 marker). ($n=3-9$; *A star above a line displays $P<0.05$; #displays significant difference between R2 at day 2 or day 8 compared with R2 at day 0 [$p<0.05$]; \$displays significant difference between R1 at day 2 compared with R1 at day 8 [$p<0.05$]. Lines display means \pm SEM for individual data).

for 96 genes are available in Supplemental Figure 5C. All *P* values are available in the Supplemental Material. Several of these targets are involved in phagocytosis, danger signaling, lymphocyte co-stimulation, migration, proliferation, activation, and the inflammasome. Because it is known that the cytoskeleton can affect macrophage activation,²⁶ it is interesting to point out that β -actin (*Actb*) was overexpressed in the glycerol condition. Chemokines known to be involved in macrophage recruitment, including *Ccl2*, *Ccl7*, and *Ccl9*, were also

induced. The simultaneous overexpression of a chemokine (*Ccl7*) and its cognate receptor (*Ccr1*) suggest the induction of an autocrine process. The only monitored gene exhibiting decreased expression levels in the glycerol condition was *H2-Aa* (CMHII) consistent with previous data.²⁷ Analyses of correlation values between expressed genes from R1-Gly and R2-Gly cells identified a group of three genes (*CD11b*, *Itgb2*, and *Fcgr3*) as a coexpression network, the upstream regulator of which could be Stat3 (Supplemental Figure 6, A and B).

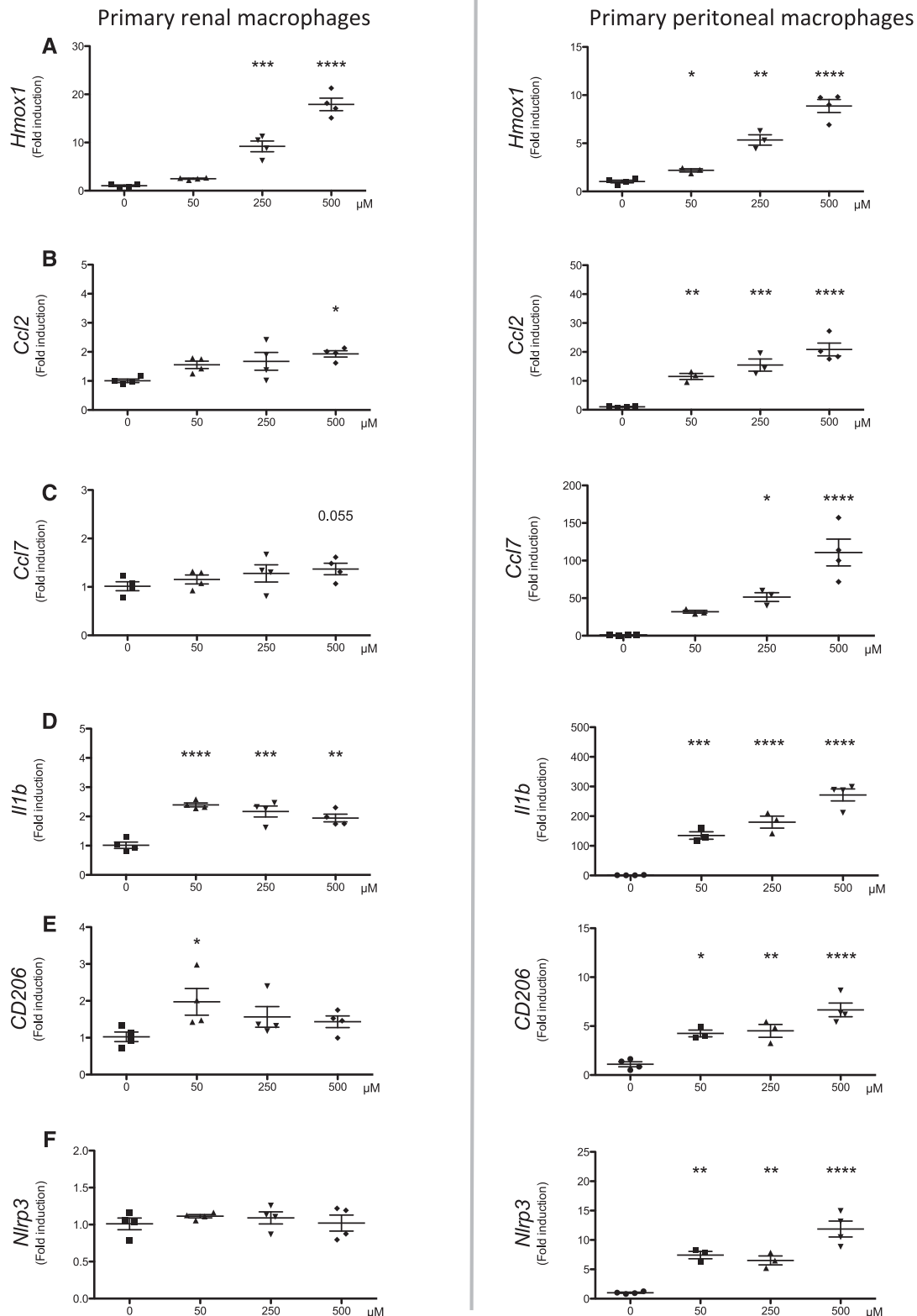


Figure 4. Myoglobin polarizes macrophages simultaneously toward M1 and M2 phenotypes *in vitro*. Primary renal macrophages (left; R2 and R1 fractions sorted from control kidneys) and peritoneal macrophages (right) were treated with increasing doses of myoglobin for 4 hours. Relative mRNA expression (fold induction) is depicted for (A) *Hmox1*, (B and C) chemoattractants *Ccl2* and *Ccl7*, (D) M1 marker (*Il1b*), (E) M2 marker (*CD206*), and (F) inflammasome transcription factor *Nlrp3*. n =pool of 11 mice for renal isolates, n =3–4 individual mice for peritoneal isolates. (* P <0.05; ** P <0.01; *** P <0.001; **** P <0.0001.)

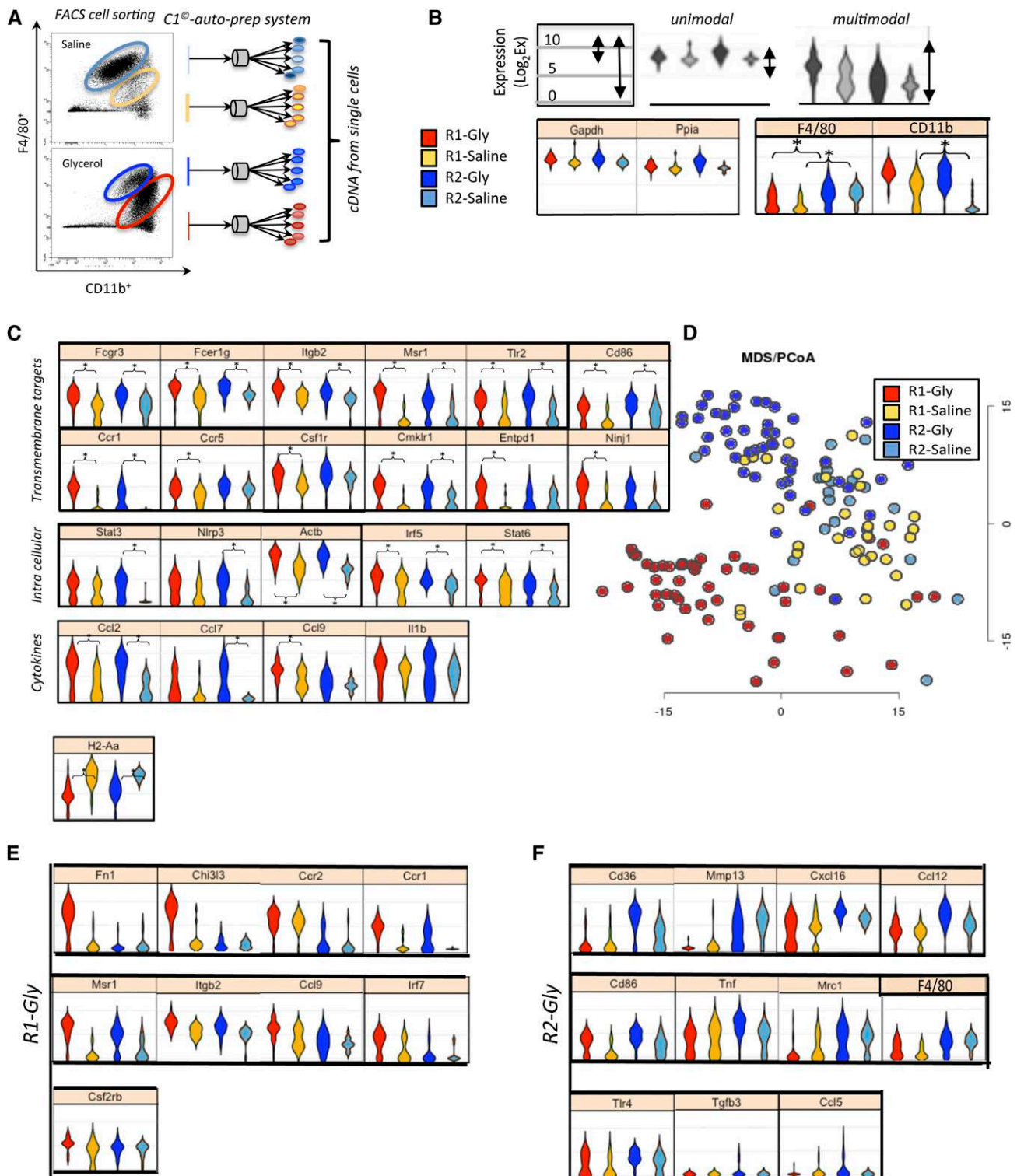


Figure 5. Rhabdomyolysis modifies individual macrophages transcriptional activity. (A) Study design. Kidney macrophages were FACS-sorted to obtain R1 (F4/80^{low}CD11b^{high}) and R2 (F4/80^{high}CD11b⁺) macrophages from mice, 2 days after intramuscular injection of saline or glycerol (Gly). Cells were loaded onto a chip to obtain cDNA from individual, viable single cells. Ninety-six mRNA expression profiles were then monitored by quantitative PCR. Data were converted into Log₂Ex, which gives a higher value for cells with better detection, and plotted as violin plots. (B) Controls. The housekeeper genes *Gapdh* and *Ppia* exhibited unimodal expression (bottom left). *F4/80* and *CD11b* mRNAs expression were consistent with proteins used in sorting (bottom right). (C) Glycerol effect. Differential gene expression between the glycerol and saline conditions. *H2-Aa* (CMH II) is the only monitored gene with a decreased expression in

Multidimensional scaled principal coordinate analysis (MDS/PCoA) with expression data from 89 detected genes shows that sorted macrophages have distinct expression profiles with the first coordinate separating cells derived from mice treated with glycerol from controls and the second further separating R1-Gly from R2-Gly (Figure 5D), cells with profiles clearly separable by hierarchical clustering (Supplemental Figure 6C). *CD209* was only detected in the R1-saline group and appeared as a potent discriminator, consistent with the high protein level observed at day 0 (Supplemental Figures 1E and 5C). Next we analyzed whether classic M1 and M2 markers were segregated as specific R1/R2 genes. M2 markers were in fact found to be expressed in both R1-Gly (*Fn1* and *Chi3l*) and R2-Gly (*CD36* or *Mrc1/CD206*) cells. However, R2-Gly cells differed from R1-Gly cells in their expression of M1 markers, such as *Tnfa*, *Tlr4*, and the chemotaxis signaling molecules *Ccl12* and *Ccl2*, as well as the antifibrotic genes *Mmp13* and *Cxcl16* (Figure 5, C, E, F).

To confirm the role of R1-Gly in rhabdomyolysis-induced AKI and validate the results obtained with single-cell transcriptional analysis, we performed macrophage depletion experiments using liposomal clodronate.

Liposomal Clodronate-Mediated Macrophage Depletion Protects against Glycerol-Induced AKI and Related Mortality

Empty liposomes (EL) or liposomal clodronate (CL) were injected intraperitoneally as indicated in the experimental workflow (Figure 6A). Neither EL nor CL had an effect in saline-treated mice. Pretreatment with CL before rhabdomyolysis was renoprotective (Supplemental Figure 7A) and significantly improved animal survival (Figure 6B and Supplemental Figure 7B). We observed a renoprotective effect irrespective of the time of injection (Figure 6C), as attested by BUN monitoring 8 days after glycerol administration (Figure 6D). Gly-CL treatment significantly improved the GFR estimated at day 2 by inulin-FITC (3.5-fold increase; $P<0.01$, data not shown). CL administration systematically depleted macrophages and was still effective in the glycerol condition in the kidney (Supplemental Figure 7, C and D). Surprisingly, from a qualitative point of view, CL also modified the macrophage phenotype (Figure 6, E–G). CL treatment reduced the abundance of R2 macrophages in the saline condition. While in the glycerol condition, CL reduced both R1 and R2 abundance; it was most significantly seen for the R1 subset, in terms of both absolute count and percentage (Figure 6G, Supplemental Figure 8).

Liposomal Clodronate-Mediated Macrophage Depletion Attenuates Kidney Lesions

Consistent with Figure 5E, CL-mediated macrophage depletion significantly reduced fibronectin deposits in the glycerol

condition (Figure 7A) at the protein level and the global mRNA level in kidneys. Results were similar with collagen III (Figure 7B). Consistent with *in vitro* (Figure 4) and *in vivo* analyses (Figure 5C), CL-mediated macrophage depletion decreased glycerol-induced *Ccl2* and *Ccl7* transcripts (Figure 7C), and the kidney structure was partially preserved from glycerol-induced lesions (Figure 7D). CL treatment reduced the glycerol-induced increase in kidney weight (from 339 ± 13 mg in the GlyEL group to 300 ± 9 mg in the GlyCL group; $P<0.05$, data not shown). To rule out influence of CL on the rhabdomyolysis response to glycerol injection, we assessed the intensity of rhabdomyolysis in CL-treated mice. CK systemic levels were similarly elevated in EL-treated and CL-treated mice (Figure 7E).

Rhabdomyolysis Promotes Long-Term Fibrosis, and Renoprotective Effects of Clodronate Are Maintained over Time

Recent evidence suggests that even “cured” AKI can progress to CKD.¹⁶ One month after rhabdomyolysis, BUN levels were still slightly elevated compared with levels in the control group (Figure 8A). The macrophage distribution between R0, R1, and R2 was similar in the control and the glycerol-treated mice with or without CL (data not shown). It has already been shown that the protective effects of CL involve $CD206^+$ reparative macrophages.²⁸ As shown in Figure 8B, CL treatment increased the $CD206^+$ cell fraction, which is known to participate in matrix collagen endocytosis (Supplemental Figure 9).²⁹ Patent fibrosis could be observed in the glycerol-treated mice, as assessed by collagen III deposits and Masson trichrome staining (Figure 8C). Consistent with the effect observed at day 2, CL led to a reduction of collagen III deposits (Figure 8, C and D). The experiment was repeated 7 months after rhabdomyolysis and showed long-term alterations in kidney function and structure (Figure 8, E–H). Kidneys from glycerol-treated mice were smaller (Figure 8F), with an uneven surface and higher collagen III deposits (Figure 8, G and H). These alterations were attenuated in CL-treated mice. Interestingly, the percentage of $CD11b^+ F4/80^+$ cells with respect to total live cells (obtained by FACS) were 2.2% (NaCl/EL), 3.7% (GlyEL), and 3.6% (GlyCL), suggesting a persistent low-grade inflammation (ANOVA $P<0.03$ for GlyEL versus NaCl/EL; $n=6-10$). Macrophage phenotyping showed no significant differences between GlyEL and GlyCL groups concerning the distribution of R1/R2 or the expression levels of Ly6-B or *CD206*.

DISCUSSION

It is extremely rare to find a thorough description of human kidney specimens in rhabdomyolysis. Recent reviews do not

glycerol-treated mice compared with saline-treated mice ($*P<0.05$). (D–F) R1–R2 comparison. (D) MDS/PCoA plot (multidimensional scaled principal coordinate analysis), which permits a global view of differences in gene expression, shows that R1-Gly and R2-Gly exhibit distinct signatures. (E) The R1-Gly-specific profile included nine genes. Of note, *Fn1* (fibronectin) and *Chi3l3* (also known as Ym-1) expression was restricted to R1-Gly. (F) The R2-Gly specific profile included 11 genes. Of note, *CD36*, *MMP-13*, and *Mrc1* (*CD206*) are M2 markers. ($P<0.05$ for R1-Gly versus R2-Gly comparison in E and F.)

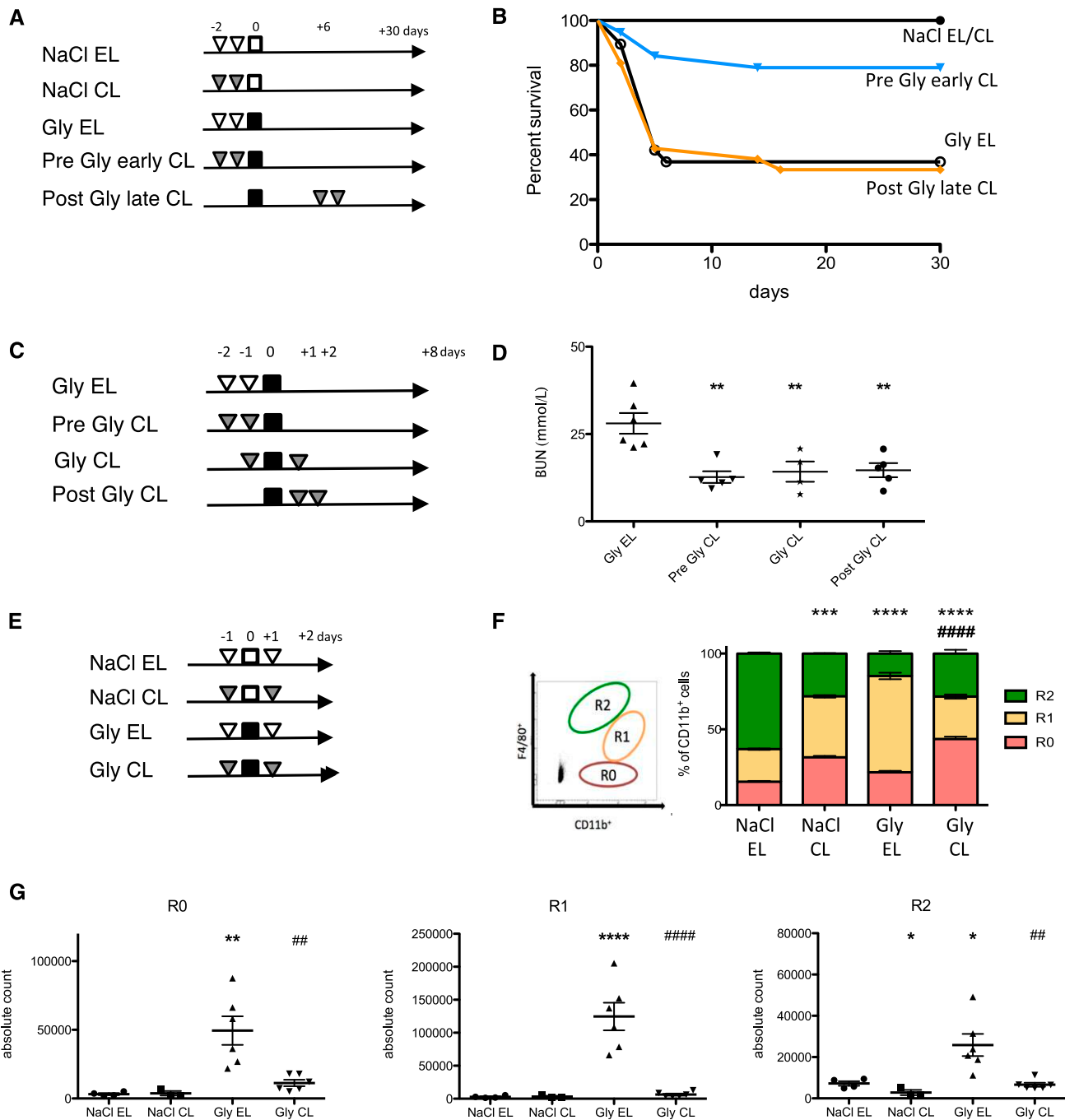


Figure 6. CL-mediated macrophage depletion protects against glycerol-induced AKI and related mortality. (A) Study design to determine whether early or late CL treatment modified survival ($n=3-20$). (B) Early CL treatment improved animal survival ($P<0.05$). Detailed mice numbers are available in Supplemental Figure 7B. (C) Study design to determine whether CL treatment before or directly after rhabdomyolysis modified the severity of AKI ($n=4-6$). (D) These three different protocols of CL treatment improved kidney function at day 8 in a similar manner ($**P<0.01$). (E) Study design to determine whether CL treatment modified macrophages subsets. (F) CD11b⁺ distribution in the three regions. $n=3-6$. (G) R0, R1, and R2 kidney macrophages counts are depicted. CL treatment predominantly decreased the R1 subset. (Versus NaCl EL: $*P<0.05$; $***P<0.001$; $****P<0.0001$. Versus Gly EL: $##P<0.01$; $####P<0.0001$.) White triangles, EL; white squares, NaCl; shaded triangles, CL; black squares, glycerol.

describe histologic findings.^{1,30} The potential clinical relevance of the present work stems from the similarities between the macrophage infiltrate observed in our patient and a

reported patient with infection-induced rhabdomyolysis.⁸ In a rat model, macrophages, defined according to F4/80 detection, have been observed 2 days after rhabdomyolysis;⁷ a

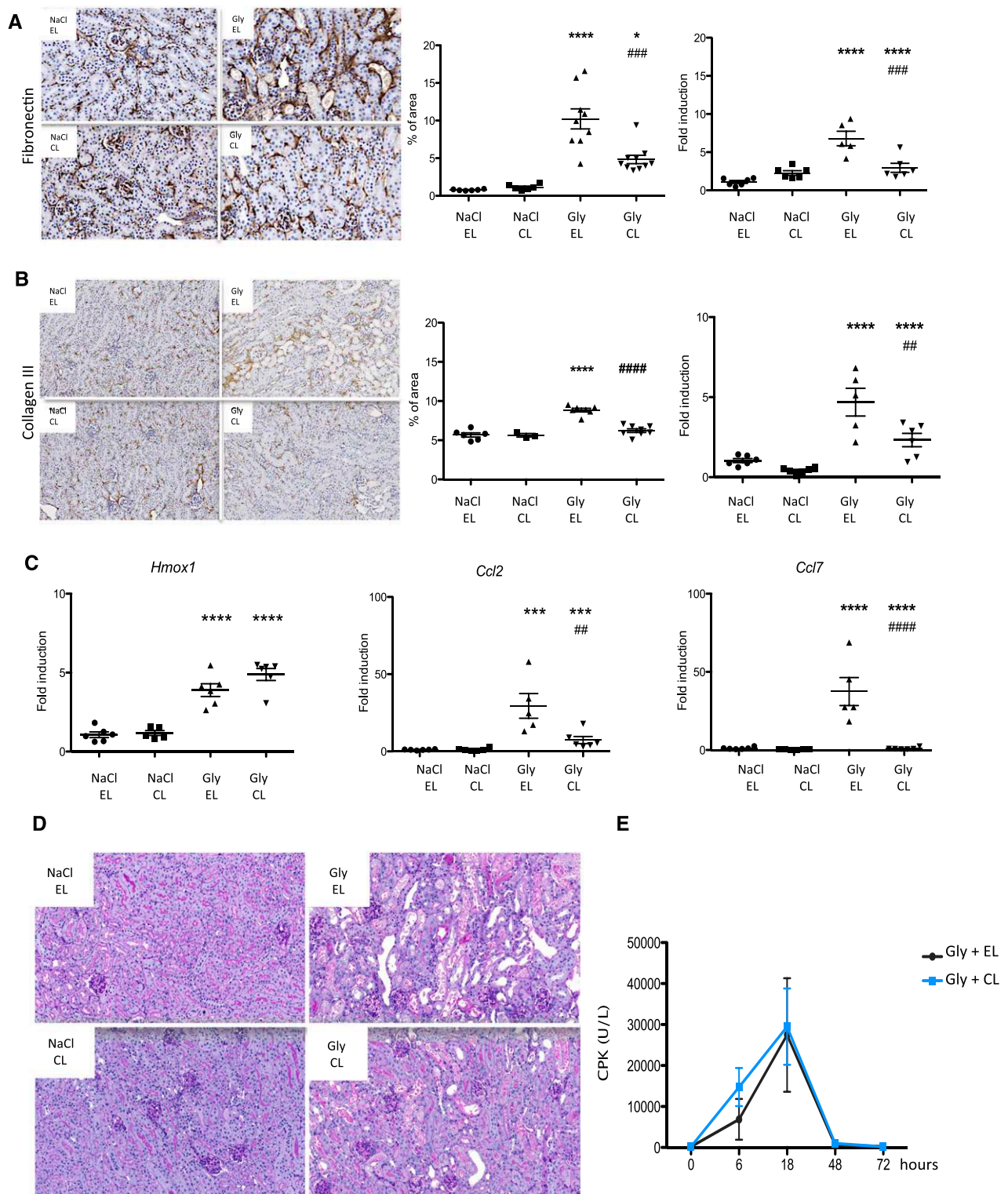


Figure 7. CL-mediated macrophage depletion attenuates kidney lesions 2 days after glycerol injection. Mice received EL or ICL in the saline (NaCl) or the glycerol (Gly) condition according to the protocol shown in Figure 6E. (A and B) CL reduced glycerol-induced fibronectin (Original magnification, $\times 400$ in A) and collagen III (Original magnification, $\times 200$ in B) accumulation at the protein level (left panel; $n=3-9$) and at the mRNA level in the whole kidney (right panel; $n=5-6$). (C) *Hmox1* was upregulated by glycerol treatment and not modified by CL. CL reduced glycerol-induced *Ccl2* and *Ccl7* mRNA expression ($n=5-6$). (Versus NaCl EL: **** $P<0.001$ and **** $P<0.0001$. Versus glycerol EL: ## $P<0.01$; ### $P<0.001$; #### $P<0.0001$.) (D) CL reduced glycerol-induced lesions on periodic acid-Schiff staining (Original magnification, $\times 200$ in representative examples). (E) CL did not affect rhabdomyolysis intensity ($n=4-8$).

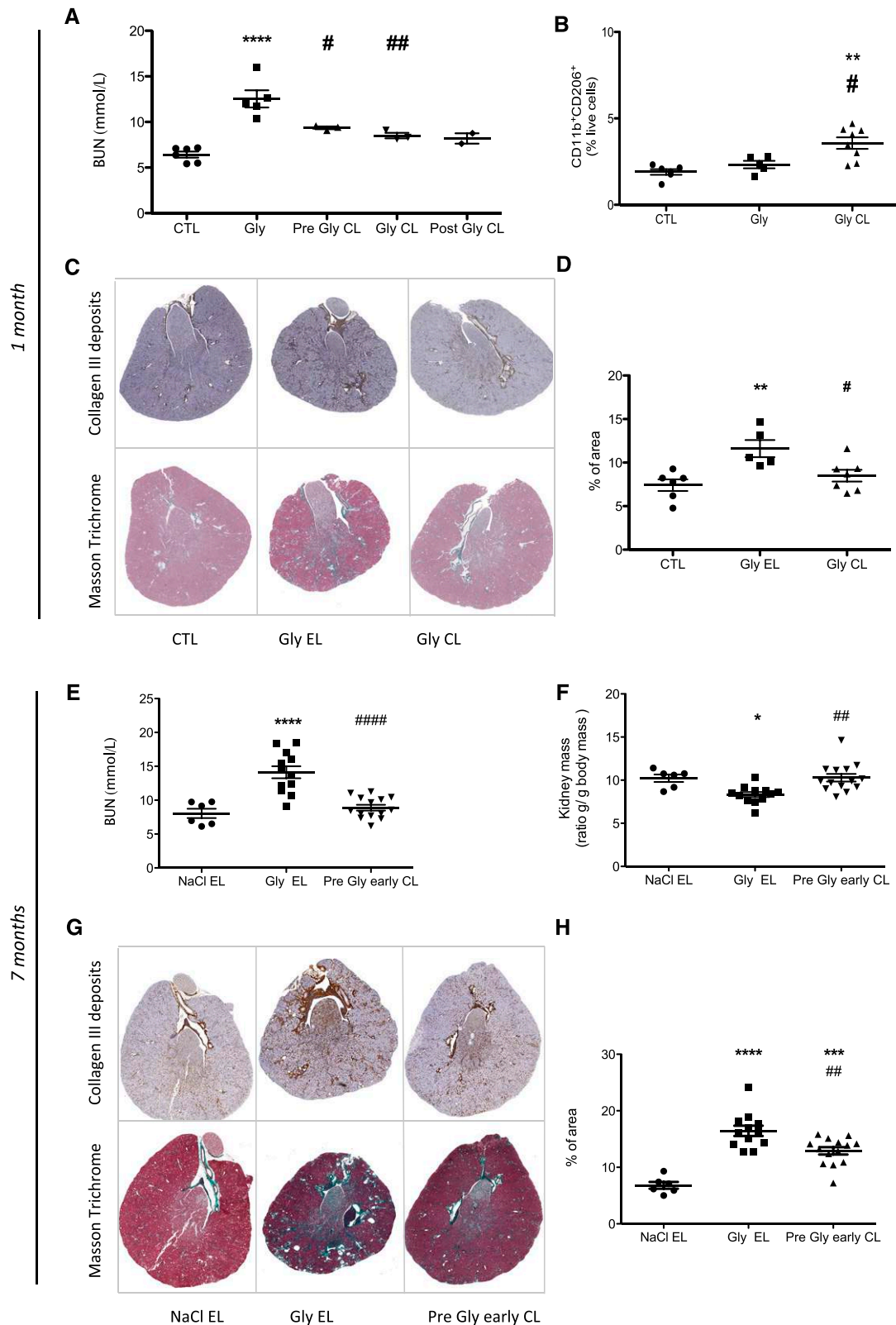


Figure 8. CL-mediated macrophage depletion attenuates kidney fibrosis. (A–D) One month after rhabdomyolysis. CTL, age-matched control group; Gly, glycerol-treated group; Gly CL, CL-treated mice according to the pre, post, and glycerol CL protocol depicted in Figure 6C. (A) BUN levels ($n=2-6$). (B) CD206⁺ expression was significantly increased in the glycerol CL condition among CD11b⁺ cells (R0, R1, and R2) ($n=5-8$). (C) Collagen III and Masson trichrome staining (representative examples are shown). (D) Collagen III deposit

detailed description of macrophage origin, infiltration, and function was lacking. Here, we identified a subset of mononuclear cells (either macrophages or dendritic cells) involved in the development of rhabdomyolysis-induced AKI.

As expected,^{24,25} R2 cells, which express CD36 and CD206, were predominant in the normal kidney. These R2 macrophages exhibited an M2-like resident phenotype. Two days after the glycerol injection, the R1 macrophage subset (F4/80^{low} CD11b^{high}) dramatically increased, as described in immune (lupus)³¹ and nonimmune renal diseases (unilateral ureteral obstruction³² and ischemia²³). Substantial infiltration of proinflammatory mononuclear cells in the early phase of rhabdomyolysis-induced injury is based on our data, potentially explained by the following mechanisms (Figure 9).

First, myoglobin exerts a direct toxic effect on the proximal tubule, prompting proximal epithelial cells to secrete macrophage-recruiting chemokines such as *Ccl2* and *Ccl7*, as previously shown in the distal tubule³³ and substantiated by data obtained *in vitro*.

Second, since R1 macrophages were found to express *Ccl2* and *Ccl7* receptors (*Ccr1*, *Ccr2*, *Ccr5*), they migrate from blood to the kidney interstitium. The high level of Ly6b expression suggests that R1-Gly macrophages predominately originate from diapedesis of monocytic precursors and not from a phenotypic switch of resident macrophages.

Third, once in the renal interstitium, myoglobin could directly activate macrophages. Exposure to myoglobin led to overexpression of the inflammasome component (*Nlrp3*) and proinflammatory factors (*Il1b*). This is consistent with (1) a recently published study showing that heme (a component of myoglobin) plays an essential role in *Il1b* secretion by macrophages during kidney inflammation³⁴ and (2) our data showing that macrophages exhibited high levels of *Nlrp3* (*in vitro* and *in vivo* for R2-Gly) and also expressed *P2rx7* (Supplemental Figure 5C). It was previously shown that myoglobin, through NO scavenging, reduced the immunosuppressive activity of IFN- γ -activated macrophages.³⁵

Our data showed simultaneous expression of M1 and M2 markers. R1-Gly macrophages display a differentiation potential toward M2 in addition to their inflammatory activity. R2-Gly cells most likely correspond to M2b macrophages, according to the classic definition of Mantovani.³⁶ Eight days and one month after the glycerol injection, the return to an R2-dominant macrophage fraction suggested a reversion from proinflammatory to a reparative state of activation, as previously proposed.⁷ R2 macrophages could contribute to renal repair by increasing the expression of enzymes involved in extracellular matrix degradation (e.g., *MMP-13* in single cell

analysis) and CD206. After 1 month, CL-treated mice showed reduced collagen III deposits accompanied by CD206 enrichment, which has been identified as a determinant actor in intracellular collagen capture.²⁹

To provide evidence for a role of macrophage in rhabdomyolysis-AKI, we depleted macrophages using CL, even though CL also depletes dendritic cells,³⁷ which are also present in the CD11b⁺F4/80⁺ fraction. CL was protective in terms of kidney structure and function and mice survival. CL treatment led to an increase of the CD206⁺ cell fraction in glycerol-treated mice, an effect previously described after ischemia.²⁸ We suggest that R1 macrophage depletion could be protective *via* two additive mechanisms: (1) a general reduction in the accumulation of ECM components such as collagen III and fibronectin (it is known that fibronectin deposits in the kidney interstitium can alter its structure and dampen kidney function,³⁸ and it has been previously reported that treatment with CL reduced fibronectin deposits in a limb-regeneration model³⁹) and (2) a decrease in the inflammatory response, especially auto- and paracrine chemoattractant loops involving *Ccl2*, *Ccl7*, and *Il1b*.

The short-term renal prognosis of rhabdomyolysis-induced AKI is relatively benign. However, recent studies increasingly emphasize the link between AKI and CKD.¹⁶ We observed a minor decrease in renal function, but this was accompanied by severe structural alterations of the kidney, including the presence of interstitial fibrosis, suggesting a shift from AKI to CKD. Beneficial effects have been reported for many chemical compounds or strategies in the context of experimental rhabdomyolysis, but none have specifically targeted subpopulations of immune cells. While macrophage depletion treatments performed within the right time frame displayed powerful effects, delayed treatments were ineffective. This indicates that any intervention aimed at R1 macrophages just after the initiation of the aggression could efficiently attenuate the development of AKI and subsequent CKD. In the more general context of the increase of incidence of AKI,^{40,41} our data have provided evidence that long-term follow-up and estimation of GFR after rhabdomyolysis could play an important role in the detection of silent fibrosis and permit patients to undergo appropriate nephroprotective measures.

CONCISE METHODS

Animal Model

C57BL/6J mice (male, 8–10 weeks old) were purchased from Janvier (Le Genest Saint Isle, France) and housed in a pathogen-free,

quantification ($n=5-7$). (Versus control: $**P<0.01$ and $****P<0.0001$. Versus Gly: $\#P<0.05$ and $##P<0.01$.) (E–H) Seven months after rhabdomyolysis. NaCl EL, glycerol EL, and pre-glycerol early CL refer to mice treated according to the protocol depicted in Figure 6A. (E) BUN levels ($n=6-14$). (F) Kidney mass indicated global atrophy after glycerol injection. ($n=6-14$) (G) Collagen III and Masson trichrome staining (representative examples are shown). (H) Collagen III deposits were still significantly increased in the glycerol condition, which was partially prevented by CL ($n=6-14$). (Versus NaCl EL: $*P<0.05$ and $****P<0.0001$. Versus glycerol: $\#P<0.05$, $##P<0.01$, $####P<0.0001$.)

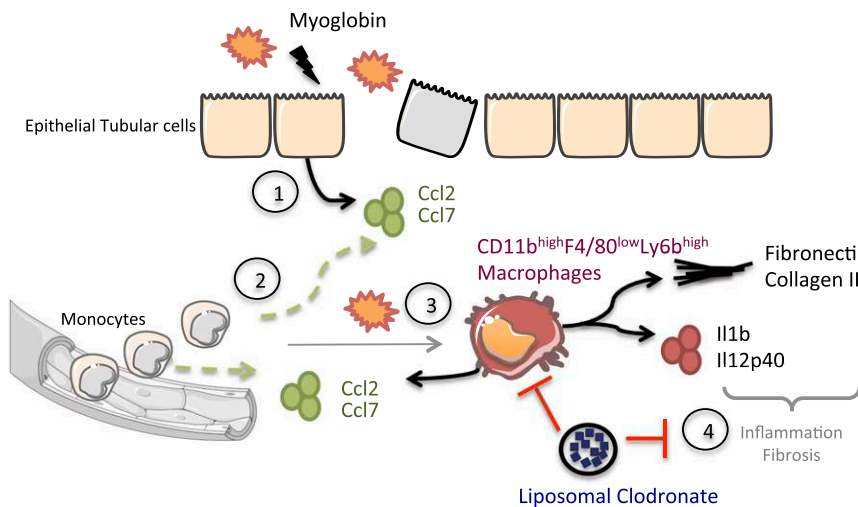


Figure 9. Proposed early mechanisms involved in rhabdomyolysis-induced kidney injury. (1) In response to myoglobin, tubular cells secrete macrophage chemoattractants (Ccl2, Ccl7). (2) In response to these chemoattractants blood monocytes migrate to the renal interstitium. (3) In addition to its effect on tubular cells, myoglobin polarizes these macrophages toward a proinflammatory phenotype. (4) CD11b^{high}F4/80^{low}Ly6b^{high} subtype macrophages enhance renal injury by secreting extracellular matrix compounds (fibronectin, collagen III), proinflammatory cytokines (IL1b, IL12p40) and by increasing recruitment of newly generated macrophages (secretion of Ccl2 and Ccl7).

violet 510 (Biolegend), anti-CD11b-PE/Cy7 (Biolegend), anti-F4/80-AF647 (Biolegend), anti-Ly6b-AF700 (AbD serotec), anti-CD206-PE (Biolegend), anti-CD209-PE (Lifespan Biosciences), anti-CD36-AF488 (Biolegend), anti-Ly6g-AF700 (Biolegend), and anti-dectin1 PerCP-eFluor710 (eBioscience). A known quantity of Countbright beads (Molecular Probes) was added. Acquisition was performed on a BD LSR-Fortessa cytometer. Standard analyses were performed on FACS Diva Software (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ). Maturation pathway analysis was performed on INFINICYT software (Cytognos SL, Salamanca, Spain).

Sorting of Macrophages Subsets

After the isolation of renal cells, as previously described, samples were stained with anti-CD45-BV510 (Biolegend), anti-CD11b-PE (Biolegend), and anti-F4/80-AF647 (Biolegend) after incubating with anti-CD16/32 (Biolegend). After one wash with PBS, the cells were sorted using the BD Influx cell sorter. Purity of cell-sorting is available in Supplemental Figure 10A.

temperature-controlled environment with a 12-hour/12-hour light/dark photocycle. Animals had free access to food and tap water to avoid dehydration-related hypovolemia. All reported experiments were conducted in accordance with National Institutes of Health guidelines for the care and use of laboratory animals and were approved by a local animal care and use committee. To induce rhabdomyolysis, the animals were intramuscularly injected in each thigh caudal muscle with 7.5 ml/kg 50% glycerol (99.5% m/v AnalaR Normapur; VWR International S.A.S., Fontenay sous Bois, France) or saline as a control.⁴² To study the effect of clodronate, a macrophage-depleting drug, liposomal clodronate (Clodrosome) or the same volume of control liposome suspension (Encapsome; Encapsula Nanosciences LLC, Nashville, TN), was administered intraperitoneally to the animals as a full dose (40 mg/kg) the day before the glycerol injection or a half-dose (20 mg/kg) the day after the glycerol injection, according to previously published protocols.⁴³

Renal Function

Blood was drawn from the mouse tail vein and serum was collected to measure BUN and creatinine. BUN and serum creatinine were measured on a Pentra 400 analyzer (Horiba Medical, Grabels, France). Serial determination of GFR in conscious mice was done by using FITC-inulin clearance as previously described.⁴⁴

Characterization of Kidney Macrophages

Kidneys were decapsulated, minced, and incubated with collagenase (2 mg/ml, Sigma-Aldrich) and DNase 1KU/ μ l (Qiagen). After red blood cell lysis, cells were passed through a 40- μ m mesh, incubated with anti-CD16/32 (Biolegend) and stained with anti-CD45-brilliant

Cell Model of Rhabdomyolysis

Myoglobin Solutions

Horse heart myoglobin (M1882; Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) was used. Myoglobin solutions were freshly prepared in PBS, filtered through 0.22- μ m filters, and diluted in culture medium to a final concentration of 50, 250, or 500 μ M according to experimental design. Absence of ferrous-oxy-myoglobin was assessed by 409-nm absorbance.

Renal Cell Stimulation with Myoglobin

MCTs were carried in Ham's F12/DMEM with 10% FCS, 1% penicillin/streptomycin, 10 ng/ml epidermal growth factor, 4 pg/ml triiodothyronine, 5 μ g/ml insulin, and 36 ng/ml hydrocortisone. Cells were seeded in six-well plates, cultured for 48 hours, washed once with PBS, and deprived of FCS for 24 hours before treatment with myoglobin.

Macrophage Stimulation

IL-4 (20 ng/ml; Shenandoah Biotechnology) and IFN- γ (20 ng/ml, Shenandoah Biotechnology)+LPS (1 μ g/ml; Sigma-Aldrich) were used as the positive controls for M2 and M1 polarization, respectively.

Peritoneal Macrophage Isolation

The peritoneal cavity of C57BL/6j mice was gently washed with 5 ml PBS. The recovered buffer was collected by centrifugation (400 g, 10 min) and plated in 24-well plates at a density of 10^6 cells/well in GlutaMAX-I (Invitrogen, Saint Aubin, France) supplemented with 5% FCS, 1% P/S. Cells were allowed to adhere for 2 hours (37°C, 5% CO₂) and were washed with PBS before incubation with fresh serum-free medium containing myoglobin or reference polarization reagents for 4 hours.

Renal Macrophage Isolation

Samples obtained from the cell sorter (CD11b⁺F4/80⁺ fraction) were plated in 96-well plates at a density of 50,000 cells/well in GlutaMAX-I supplemented with 5% FCS, 1% P/S. Cells were allowed to adhere for 2 hours (37°C, 5% CO₂) and were washed with PBS before incubation with fresh serum-free medium containing myoglobin or reference polarization reagents for 4 hours.

CCL2 and CCL7 Detection

Culture supernatants were obtained 48 hours after the myoglobin treatment, centrifuged at 400 g for 10 minutes, and stored at −80°C. ELISA was performed using Peprotech kits 900-K123 and 900-M126 (Peprotech, Neuilly sur Seine, France) according to the manufacturer's protocol.

Single-Cell Gene Expression

Samples obtained from the cell sorter were subjected to C1 Single-Cell Auto Prep System according to the manufacturer's protocol (PN 100–4904 A1, Fluidigm). Biomark quantitative PCR was performed according to the manufacturer's protocol (ADP37, Fluidigm). Primers were DELTAgene Assays (ASY-GE, Fluidigm) and had previously been tested to assure efficiency and specificity (absence of primer dimers) and to rule out genomic DNA cross-reactivity (see sequences in Supplemental Figure 10B). Data were exported in heatmap (csv) format for analyses in SINGuLAR according to the manufacturer's protocol and in R for MDS/PCoA and hierarchical clustering analyses.

Gene Expression Quantification

Total RNA was isolated from mouse kidneys or macrophages using Qiagen RNEasy Plus Mini kit (Qiagen, Valencia, CA). Reverse transcription was performed on a FlexCycler2 (Analytik Jena AG, Jena, Germany). Quantitative PCR amplification was performed on a StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Primer sequences are listed in Supplemental Figure 11. The integrity of RNA was assessed by the 3':5' amplicon ratio.

Histologic Analysis

We retrospectively analyzed paraffin sections of kidney biopsy specimens from patients referred for diagnostic evaluation in the Department of Nephrology and Organ Transplantation at Rangueil University Hospital, Toulouse, France. All patients gave informed consent for the use of part of the biopsy for scientific purposes. All procedures were performed according to national ethical guidelines and were in accordance with the Declaration of Helsinki. Cell components revelation method and anti-CD68 detection were performed at the Department of Pathology. Regarding the murine model of rhabdomyolysis, kidney, liver, and spleen were fixed in Carnoy solution. Routine histology and immunohistological staining and analysis were performed. Briefly, 2–4 μm paraffin-embedded tissue sections were cut and used for immunohistochemistry. Periodic Acid–Schiff coloration was performed using Hematoxylin (S3309; Dako, Trappes, France), Periodic acid (198401000; Thermo Fisher Scientific, Geel, Belgium), and Schiff reagent (109033; EMD Millipore, Darmstadt, Germany). Mouse tissues were first de-waxed in toluene and rehydrated through a series of graded ethanol washes before endogenous peroxidase blockage. Specific

primary antibodies were incubated on mouse tissue sections for the detection of F4/80 (rat anti-mouse, 1/100, clone BM8, MF48000; Invitrogen, Saint Aubin, France), collagen III (rabbit anti-mouse, BP8014; Acris Antibodies GmbH, Herford, Germany) or fibronectin (rabbit anti-human/mouse, F3648; Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). Streptavidin-HRP revelation was performed using a biotinylated anti-rat IgG (BA-4001; Vector Laboratories, Bruliongame, Canada). For the visualization of rabbit antibodies we used the Dako Envision system (K4010; Dako, les Ulis, France). Finally, sections were counterstained with hematoxylin. Negative controls for the immunohistochemical procedures included substitution of the primary antibody with non-immune sera. Sections were scanned using a Nanozoomer 2.0 RS (Hamamatsu Photonics SARL, Massy, France) and treated with the commercially available Morpho-expert image-analysis software (version 1.00; Explora Nova, La Rochelle, France) for morphometric analyses.

Statistical Analyses

For statistical comparisons involving more than two experimental groups, one-way ANOVA was used. For comparisons between two data sets, unpaired *t* tests were used.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank S. Rascalou and M. Gillet for technical assistance with the animal model, C. Pecher for her technical assistance and expertise in flow cytometry (cytometry and cell sorting platform, INSERM Toulouse University, UPS UMR 1048, Toulouse, RIO imaging platform), and J.J. Maoret for his technical assistance and expertise in quantitative PCR (GeT Genome and Transcriptome Platform, Toulouse Genopole INSERM and Toulouse University, UPS UMR 1048, Toulouse). We thank A. Desquesnes for performing serum BUN and serum creatinine measurements and J.J. Soueix for his help in manuscript finalization.

J.B. was supported by “Ecole de l'INSERM Liliane Bettencourt” MD-PhD program and received doctoral grants from INSERM and Toulouse University Hospital.

DISCLOSURES

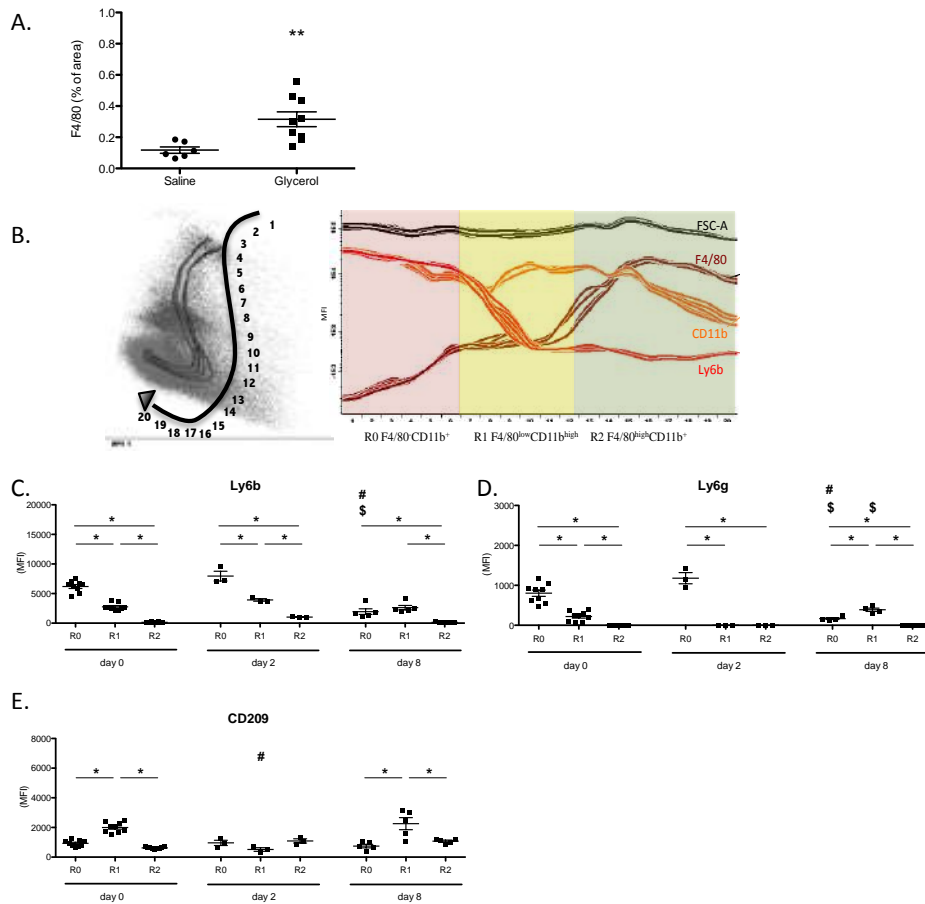
None.

REFERENCES

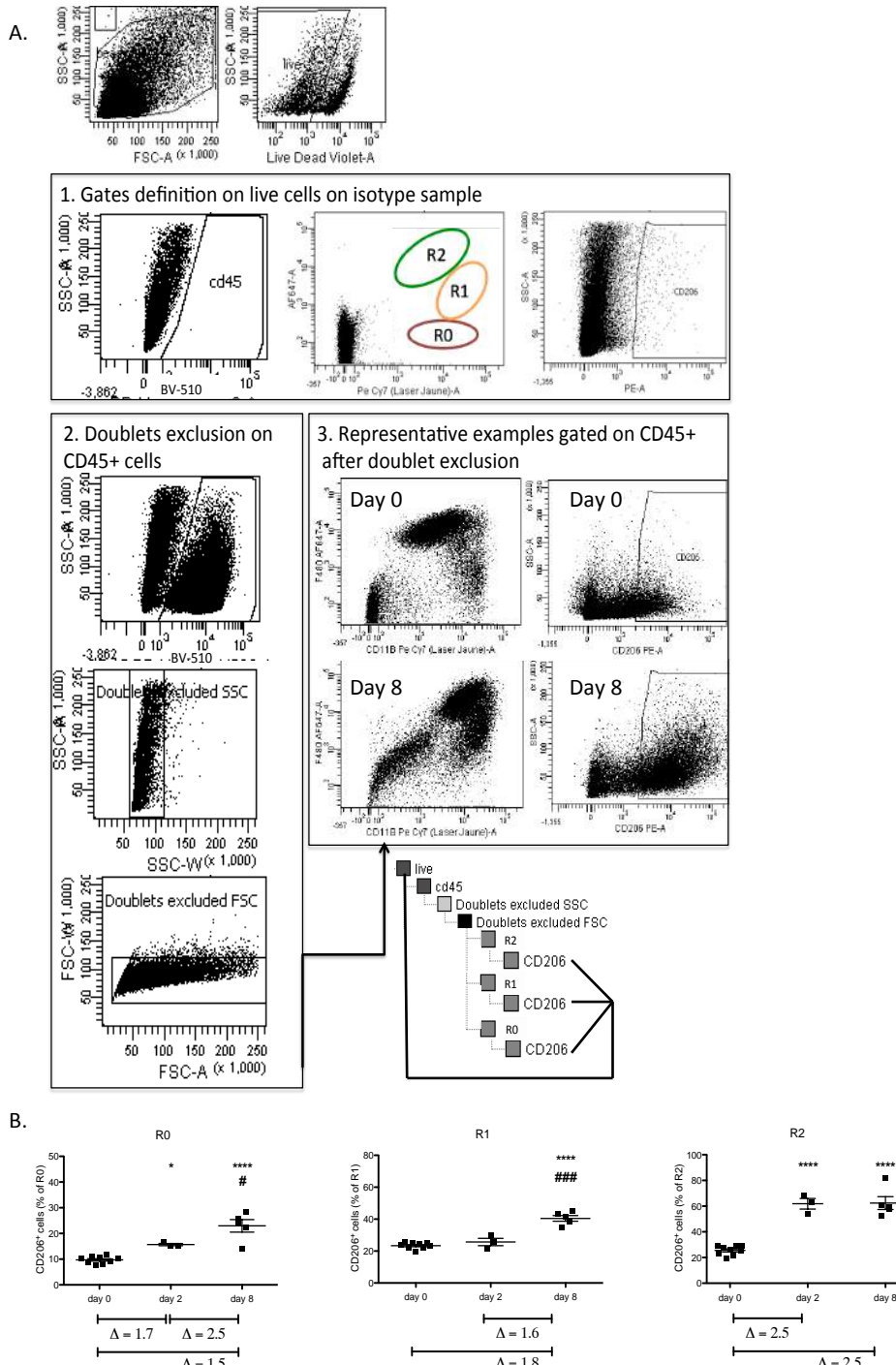
1. Bosch X, Poch E, Grau JM: Rhabdomyolysis and acute kidney injury. *N Engl J Med* 361: 62–72, 2009
2. Zarjou A, Bolisetty S, Joseph R, Traylor A, Apostolov EO, Arosio P, Balla J, Verlander J, Darshan D, Kuhn LC, Agarwal A: Proximal tubule H-ferritin mediates iron trafficking in acute kidney injury. *J Clin Invest* 123: 4423–4434, 2013
3. Zager RA: Studies of mechanisms and protective maneuvers in myoglobinuric acute renal injury. *Lab Invest* 60: 619–629, 1989
4. Zager RA, Gamelin LM: Pathogenetic mechanisms in experimental hemoglobinuric acute renal failure. *Am J Physiol* 256: F446–F455, 1989

5. Föhling M, Mathia S, Paliege A, Koesters R, Mrowka R, Peters H, Persson PB, Neumayer HH, Bachmann S, Rosenberger C: Tubular von Hippel-Lindau knockout protects against rhabdomyolysis-induced AKI. *J Am Soc Nephrol* 24: 1806–1819, 2013
6. Bonventre JV, Zuk A: Ischemic acute renal failure: An inflammatory disease? *Kidney Int* 66: 480–485, 2004
7. Homsí E, Janino P, de Faria JB: Role of caspases on cell death, inflammation, and cell cycle in glycerol-induced acute renal failure. *Kidney Int* 69: 1385–1392, 2006
8. Sinniah R, Lye W: Acute renal failure from myoglobinuria secondary to myositis from severe falciparum malaria. *Am J Nephrol* 20: 339–343, 2000
9. Anders HJ, Ryu M: Renal microenvironments and macrophage phenotypes determine progression or resolution of renal inflammation and fibrosis. *Kidney Int* 80: 915–925, 2011
10. Nelson PJ, Rees AJ, Griffin MD, Hughes J, Kurts C, Duffield J: The renal mononuclear phagocytic system. *J Am Soc Nephrol* 23: 194–203, 2012
11. Scholz J, Lukacs-Kornek V, Engel DR, Specht S, Kiss E, Eitner F, Floege J, Groene HJ, Kurts C: Renal dendritic cells stimulate IL-10 production and attenuate nephrotoxic nephritis. *J Am Soc Nephrol* 19: 527–537, 2008
12. Tadagavadi RK, Reeves WB: Renal dendritic cells ameliorate nephrotoxic acute kidney injury. *J Am Soc Nephrol* 21: 53–63, 2010
13. Kitamoto K, Machida Y, Uchida J, Izumi Y, Shiota M, Nakao T, Iwao H, Yukimura T, Nakatani T, Miura K: Effects of liposome clodronate on renal leukocyte populations and renal fibrosis in murine obstructive nephropathy. *J Pharmacol Sci* 111: 285–292, 2009
14. Lu L, Faubel S, He Z, Andres Hernandez A, Jani A, Kedl R, Edelstein CL: Depletion of macrophages and dendritic cells in ischemic acute kidney injury. *Am J Nephrol* 35: 181–190, 2012
15. Griffin MD: Mononuclear phagocyte depletion strategies in models of acute kidney disease: What are they trying to tell us? *Kidney Int* 82: 835–837, 2012
16. Murugan R, Kellum JA: Acute kidney injury: What's the prognosis? *Nat Rev Nephrol* 7: 209–217, 2011
17. Grgic I, Campanholle G, Bijol V, Wang C, Sabbisetti VS, Ichimura T, Humphreys BD, Bonventre JV: Targeted proximal tubule injury triggers interstitial fibrosis and glomerulosclerosis. *Kidney Int* 82: 172–183, 2012
18. Chawla LS, Kimmel PL: Acute kidney injury and chronic kidney disease: An integrated clinical syndrome. *Kidney Int* 82: 516–524, 2012
19. Kinsey GR: Macrophage dynamics in AKI to CKD progression. *J Am Soc Nephrol* 25: 209–211, 2014
20. Lech M, Grobmayr R, Ryu M, Lorenz G, Hartner I, Mulay SR, Susanti HE, Kobayashi KS, Flavell RA, Anders HJ: Macrophage phenotype controls long-term AKI outcomes—kidney regeneration versus atrophy. *J Am Soc Nephrol* 25: 292–304, 2014
21. Melli G, Chaudhry V, Cornblath DR: Rhabdomyolysis: An evaluation of 475 hospitalized patients. *Medicine (Baltimore)* 84: 377–385, 2005
22. Sathyan S, Baskharoun R, Perlman AS: Prevention of recurrent episodes of rhabdomyolysis with tacrolimus in a transplant recipient with myopathy [published online ahead of print February 20, 2013]. *Am J Ther* doi: 10.1097/MJT.0b013e318274df46
23. Lee S, Huen S, Nishio H, Nishio S, Lee HK, Choi BS, Ruhrberg C, Cantley LG: Distinct macrophage phenotypes contribute to kidney injury and repair. *J Am Soc Nephrol* 22: 317–326, 2011
24. Fujiu K, Manabe I, Nagai R: Renal collecting duct epithelial cells regulate inflammation in tubulointerstitial damage in mice. *J Clin Invest* 121: 3425–3441, 2011
25. Kawakami T, Lichtnekert J, Thompson LJ, Karna P, Bouabe H, Hohl TM, Heinecke JW, Ziegler SF, Nelson PJ, Duffield JS: Resident renal mononuclear phagocytes comprise five discrete populations with distinct phenotypes and functions. *J Immunol* 191: 3358–3372, 2013
26. McWhorter FY, Wang T, Nguyen P, Chung T, Liu WF: Modulation of macrophage phenotype by cell shape. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 17253–17258, 2013
27. Barrionuevo P, Beigier-Bompadre M, Fernandez GC, Gomez S, Alves-Rosa MF, Palermo MS, Isturiz MA: Immune complex-Fcγ3 interaction modulates monocyte/macrophage molecules involved in inflammation and immune response. *Clin Exp Immunol* 133: 200–207, 2003
28. Ferenbach DA, Sheldrake TA, Dhaliwal K, Kipari TM, Marson LP, Kluth DC, Hughes J: Macrophage/monocyte depletion by clodronate, but not diphtheria toxin, improves renal ischemia/reperfusion injury in mice. *Kidney Int* 82: 928–933, 2012
29. Madsen DH, Leonard D, Masedunskas A, Moyer A, Jürgensen HJ, Peters DE, Amornphimoltham P, Selvaraj A, Yamada SS, Brenner DA, Burgdorf S, Engelholm LH, Behrendt N, Holmbeck K, Weigert R, Bugge TH: M2-like macrophages are responsible for collagen degradation through a mannose receptor-mediated pathway. *J Cell Biol* 202: 951–966, 2013
30. Vanholder R, Sever MS, Ereke E, Lameire N: Rhabdomyolysis. *J Am Soc Nephrol* 11: 1553–1561, 2000
31. Iwata Y, Boström EA, Menke J, Rabacal WA, Morel L, Wada T, Kelley VR: Aberrant macrophages mediate defective kidney repair that triggers nephritis in lupus-susceptible mice. *J Immunol* 188(9): 4568–4580, 2012
32. Fujiu K, Manabe I, Nagai R: Renal collecting duct epithelial cells regulate inflammation in tubulointerstitial damage in mice. *J Clin Invest* 121(9): 3425–3441, 2011
33. Shanu A, Groebler L, Kim HB, Wood S, Weekley CM, Aitken JB, Harris HH, Witting PK: Selenium inhibits renal oxidation and inflammation but not acute kidney injury in an animal model of rhabdomyolysis. *Antioxid Redox Signal* 18: 756–769, 2013
34. Li Q, Fu W, Yao J, Ji Z, Wang Y, Zhou Z, Yan J, Li W: Heme induces IL-1β secretion through activating NLRP3 in kidney inflammation. *Cell Biochem Biophys* 69: 495–502, 2014
35. Tomioka H, Saito H: Characterization of immunosuppressive functions of murine peritoneal macrophages induced with various agents. *J Leukoc Biol* 51: 24–31, 1992
36. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M: The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol* 25: 677–686, 2004
37. Dong X, Swaminathan S, Bachman LA, Croatt AJ, Nath KA, Griffin MD: Resident dendritic cells are the predominant TNF-secreting cell in early renal ischemia-reperfusion injury. *Kidney Int* 71: 619–628, 2007
38. Castelletti F, Donadelli R, Banterla F, Hildebrandt F, Zipfel PF, Bresin E, Otto E, Skerka C, Renieri A, Todeschini M, Caprioli J, Caruso RM, Artuso R, Remuzzi G, Noris M: Mutations in FN1 cause glomerulopathy with fibronectin deposits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 2538–2543, 2008
39. Godwin JW, Pinto AR, Rosenthal NA: Macrophages are required for adult salamander limb regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 9415–9420, 2013
40. Lameire NH, Bagga A, Cruz D, De Maeseneer J, Endre Z, Kellum JA, Liu KD, Mehta RL, Pannu N, Van Biesen W, Vanholder R: Acute kidney injury: An increasing global concern. *Lancet* 382: 170–179, 2013
41. Siew ED, Himmelfarb J: The inexorable rise of AKI: Can we bend the growth curve? *J Am Soc Nephrol* 24: 3–5, 2013
42. Wei Q, Hill WD, Su Y, Huang S, Dong Z: Heme oxygenase-1 induction contributes to renoprotection by G-CSF during rhabdomyolysis-associated acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 301: F162–F170, 2011
43. Zhang MZ, Yao B, Yang S, Jiang L, Wang S, Fan X, Yin H, Wong K, Miyazawa T, Chen J, Chang I, Singh A, Harris RC: CSF-1 signaling mediates recovery from acute kidney injury. *J Clin Invest* 122: 4519–4532, 2012
44. Qi Z, Whitt I, Mehta A, Jin J, Zhao M, Harris RC, Fogo AB, Breyer MD: Serial determination of glomerular filtration rate in conscious mice using FITC-inulin clearance. *Am J Physiol Renal Physiol* 286: F590–F596, 2004

This article contains supplemental material online at <http://jasn.asnjournals.org/lookup/suppl/doi:10.1681/ASN.2014040320/-/DCSupplemental>.



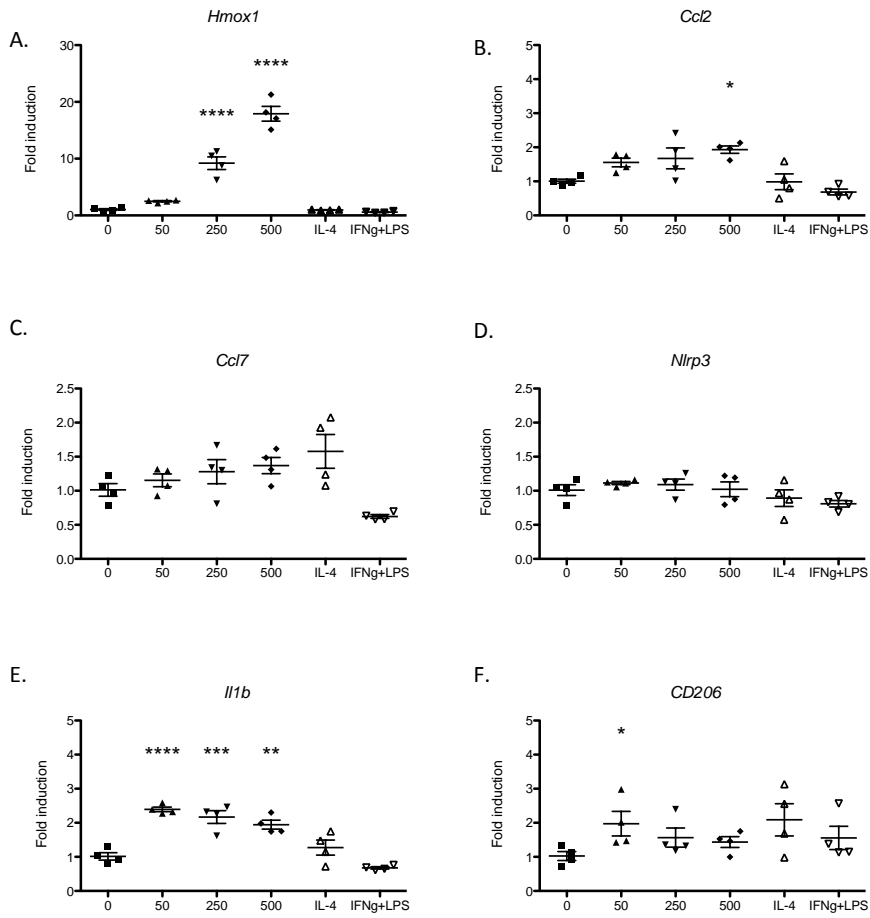
Supplemental figure 1. Macrophage infiltration in the kidney after rhabdomyolysis. (A) Macrophages were recruited in the renal interstitium (F4/80 staining, N=6-9, **p<0.01). (B) Flow cytometric analysis of the viable CD45⁺ population in suspensions derived from kidneys. Three regions were discriminated according to expression levels of CD11b and F4/80 as follows : F4/80^{low}CD11b⁺ (R0), F4/80^{low}CD11b^{high} (R1) and F4/80^{high}CD11b⁺ (R2). Maturation pathway at day 0 Principal component analysis (PCA) was applied on CD45 cells and viewed through the automated population separator (APS). A virtual pathway was drawn and arbitrary subdivided into 20 consecutive regions. MFI (mean fluorescence intensity) is depicted along the “maturation pathway” for the 20 regions. Each curve represents a mice (N=4). Note progressive decrease in CD11b and Ly6-B expression, and parallel increase in F4/80 along the “pathway”. The three populations separated by APS corresponded well to R0, R1, R2. (C-E) Macrophage sub-populations were characterized by expression of surface markers using flow-cytometry: MFI (mean fluorescence intensity) is reported on the y-axis for the following markers: (C) Ly6b (recently activated macrophages), (D) Ly6g (granulocytes), (E) CD209 (DC-SIGN). N=3-9, *p<0.05, #p<0.05 compared to day 0, \$p<0.05 compared to day 2.



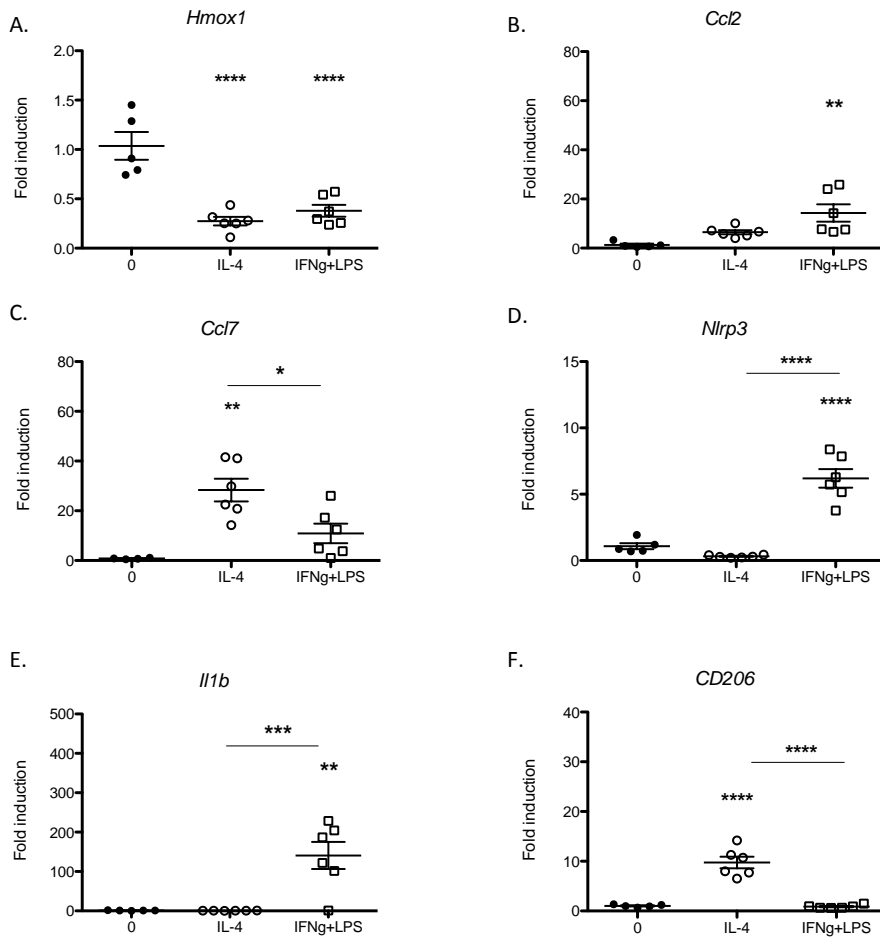
Supplemental figure 2. CD206 expression. (A) Gating strategy for After defining gates on live cells using isotype controls (1), doublets were excluded (2). Representative examples gated on CD45+ cells after doublet exclusion are depicted, day 0 and day 8 after rhabdomyolysis (3). 25000 events are shown. Population hierarchy is depicted under dotplots. CD206 positive events are analyzed as specified in the corresponding figure legends:

- either in each macrophages subset and expressed as the percentage versus R0, R1 or R2 (CD206 in R0, CD206 in R1, CD206 in R2)
- or in total live cells as CD11b⁺CD206⁺ cells (sum of CD206 in R0 + CD206 in R1 + CD206 in R2).

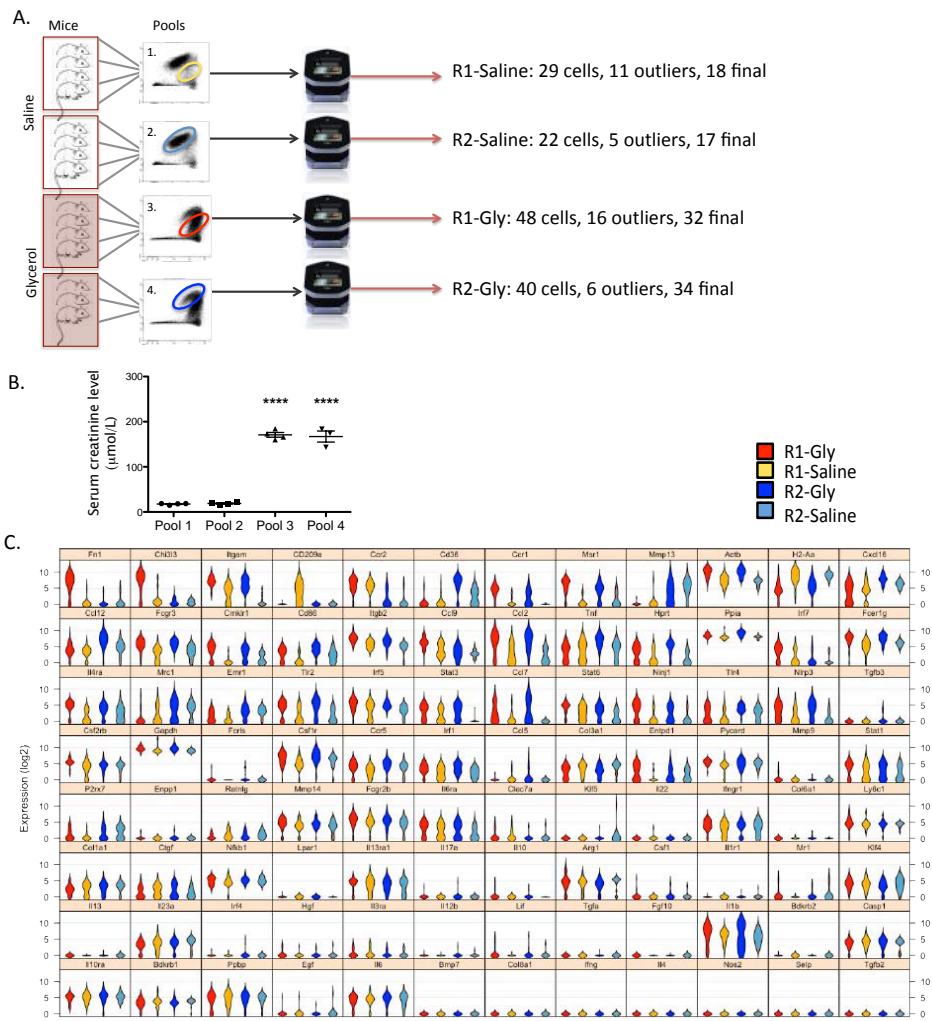
(B) Percentage of CD206⁺ cells in each macrophage subset (R0 (F4/80⁺CD11b⁺), R1 (F4/80^{low}CD11b^{high}) and R2 (F4/80^{high}CD11b⁺)) 2 and 8 days after glycerol injection. Significant proportional differences (symbolized as Δ , obtained by dividing proportion by control (day 0)) are reported under the graph. *p<0.05, **p<0.01, *** p<0.001 and ****p<0.0001 compared to control (day 0). #p<0.05, ###p<0.001 compared to day 2. N=3-9.



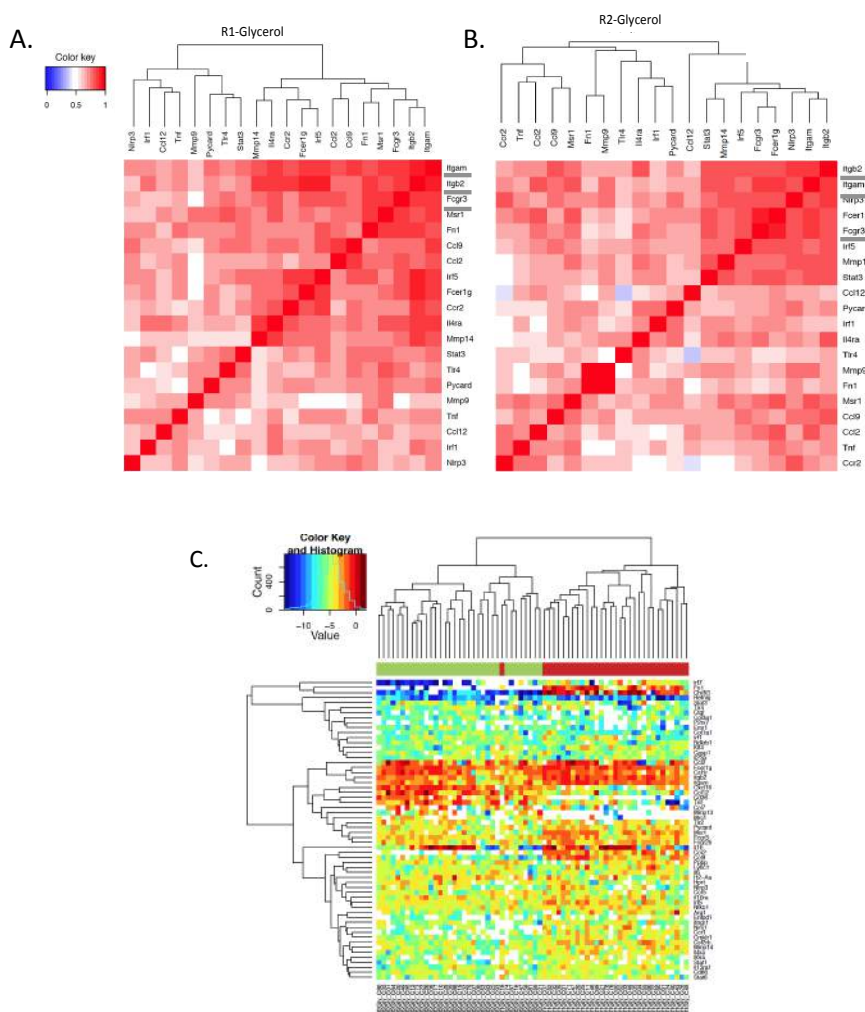
Supplemental figure 3. Kidney macrophages are sensitive to myoglobin stimulation. Kidney macrophages (R2 and R1) were treated for four hours with increasing doses of myoglobin or with IL-4 (20 ng/mL) or IFNg (20ng/mL) in combination with LPS (1µg/mL). Relative mRNA expression (fold induction) is depicted for **(A)** Heme-oxygenase (*Hmox1*), **(B-C)** chemo-attractants *Ccl2* and *Ccl7*, **(D)** inflammasome transcription factor *Nlrp3* **(E)** M1-marker *Il1b* and **(F)** M2-marker *CD206*. N=4 replicates of a pool of 11 mice, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 and ****p<0.0001.



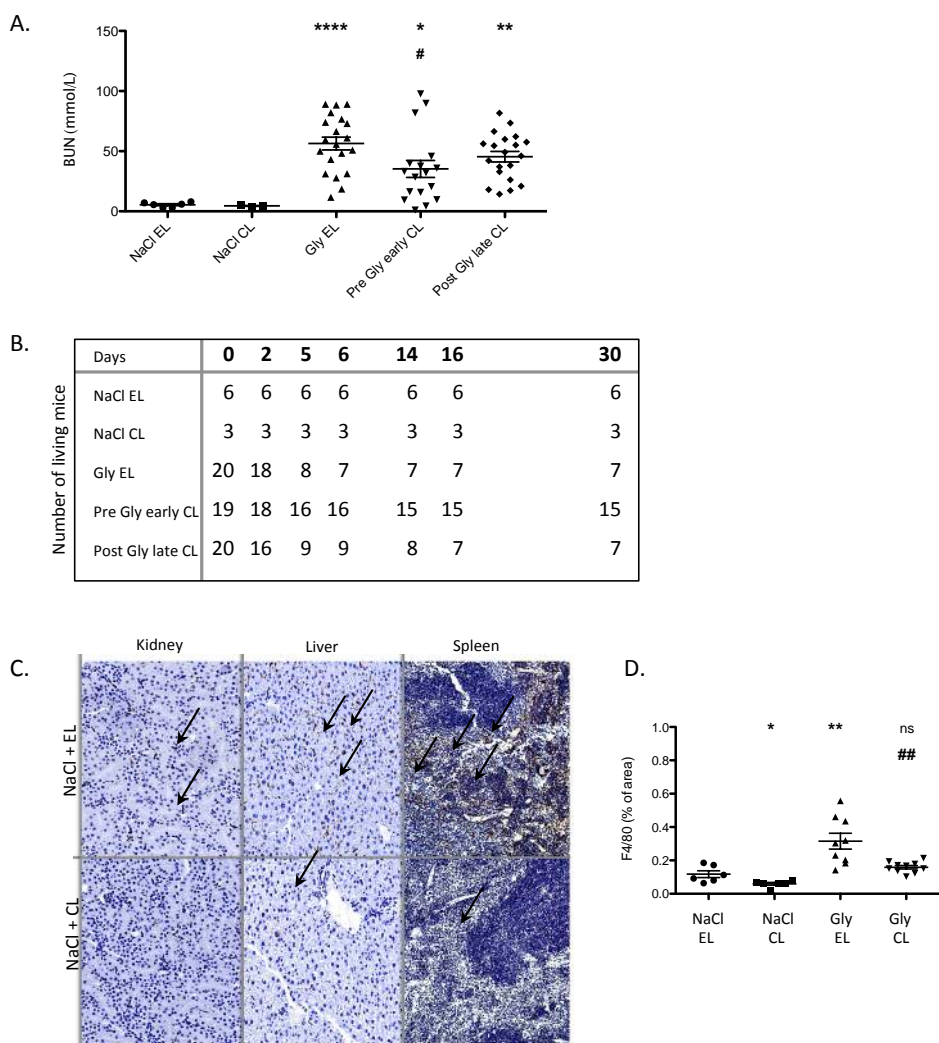
Supplemental figure 4. Macrophages respond to M1 and M2 polarization *in vitro*. Peritoneal macrophages were treated for four hours with IL-4 (20 ng/mL) or IFN γ (20ng/mL) in combination with LPS (1 μ g/mL). Relative mRNA expression (fold induction) is depicted for **(A)** Heme-oxygenase (*Hmox1*), **(B-C)** chemo-attractants *Ccl2*, *Ccl7*, **(D)** inflammasome transcription factor *Nlrp3* **(E)** M1-marker *Il1b* and **(F)** M2-marker *CD206*. N=6 mice, *p<0.05, **p<0.01, *** p<0.001 and ****p<0.0001.



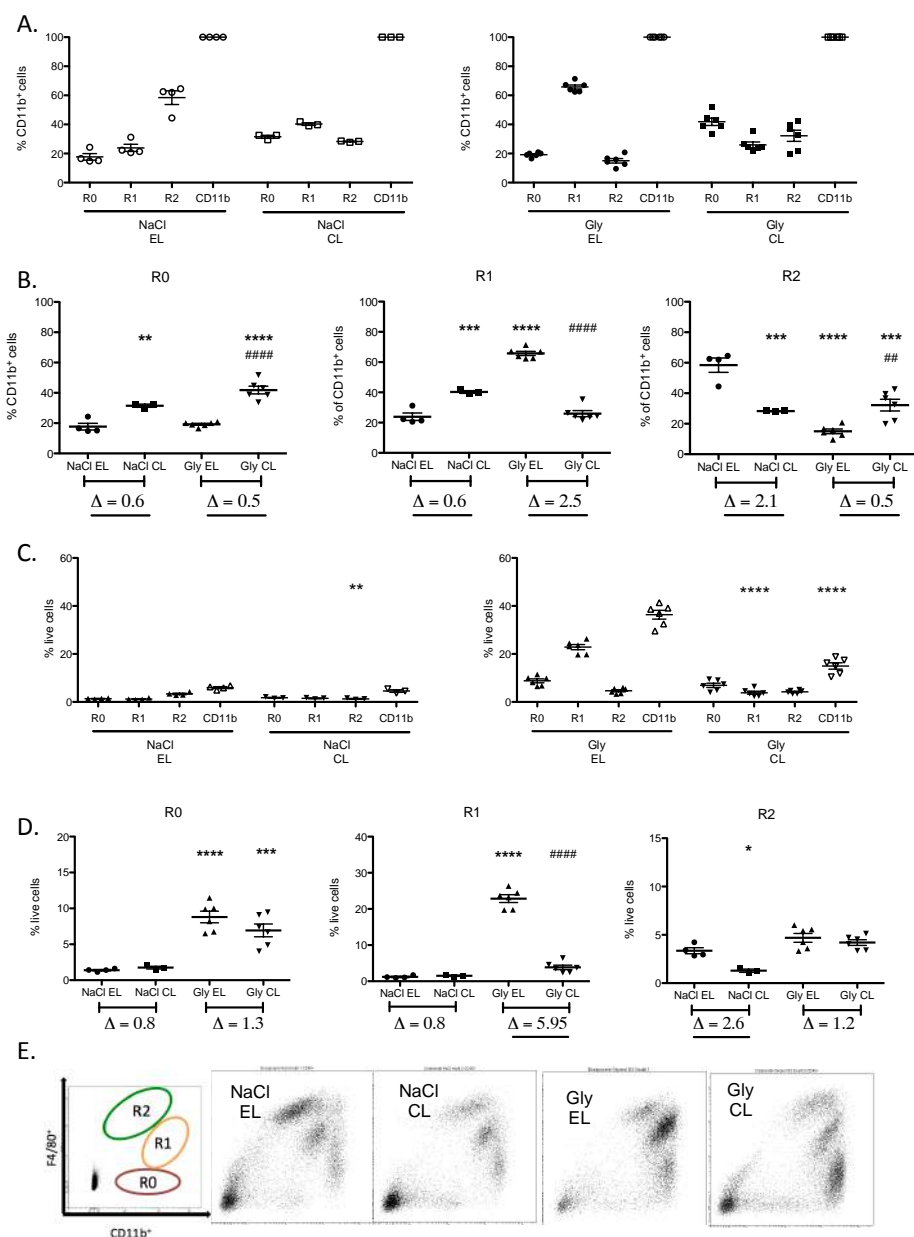
Supplemental figure 5. Single-cell experiment. (A) Study design depicting sample size. **(B)** Kidney function of mice used for single-cell experiment attested by serum creatinine level. N=3-4. **(C)** Violin plots obtained for 96 genes and 4 populations, ordered by ANOVA p-values.



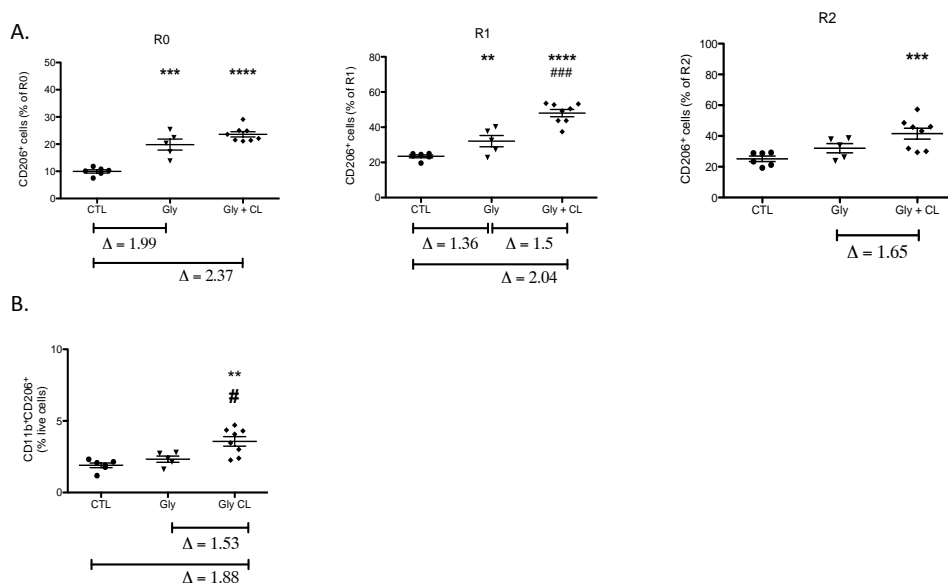
Supplemental figure 6. Single-cell analysis. (A-B) Hierarchical clustering of Spearman rank correlations between pairs of genes for R1-Glycerol cells (A) or R2-Glycerol cells (B). Genes in heat map are ordered according to the clustering performed for the group. Positive correlation (red) may result from the coordinate expression or lack of expression of pairs of factors in individual cells, whereas negative correlations (blue) can result either from the expression of one factor and the absence of the other, or from high expression of one factor and a reciprocal low expression of the other in the same cell. Underlined genes are strongly co-expressed genes that are common to R1 and R2. An *in silico* analysis using these three genes identified *Stat3* as a possible common upstream transcription regulator, with a significant p-value of 2.29×10^{-5} attributed to the overlap between upstream regulators, as provided by Ingenuity's Pathway Analysis. **(C)** Hierarchical clustering of gene expression between R1-Glycerol cells (red) or R2-Glycerol cells (green), showing a clear distinct gene signature between the two subsets. N=66 cells (32 R1-Gly and 34 R2-Gly).



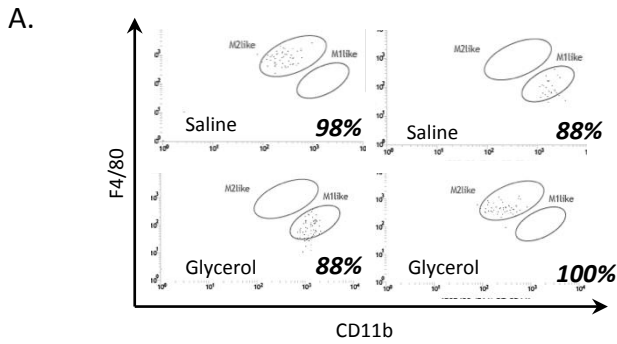
Supplemental figure 7. Liposomal clodronate-mediated protective effects. (A-B) Mice received intra-peritoneal injection of empty liposomes (EL) or liposomal clodronate (CL) and intra-muscular injection of either saline (NaCl) or glycerol (Gly), according to figure 6A. (A) Pre-treatment with CL before rhabdomyolysis prevented rhabdomyolysis-induced BUN increase 2 days after glycerol (* $p < 0.05$) and (B) significantly improved animal survival. Detailed living mice number during the protocol are detailed for each group. (C-D) Mice received (EL) or (CL) and (NaCl) or (Gly), according to figure 6B. (C) F4/80 staining on kidney, liver and spleen sections, showing that liposomal clodronate induced drastic macrophages depletion. (D) F4/80 staining on kidney showing that depleting effect was maintained even after glycerol injection. N=6-9. (versus NaCl EL: * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$; versus Gly EL: # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$).



Supplemental figure 8. Liposomal clodronate-mediated macrophages depletion. Mice received intra-peritoneal injection of empty liposomes (EL) or liposomal clodronate (CL) and intra-muscular injection of either saline (NaCl) or glycerol (Gly), according to figure 6A. Clodronate predominantly decreased the R1 fraction after rhabdomyolysis. **(A-B)** Relative R0, R1, R2 proportions among CD11b cells are depicted. **(A)** Values corresponding to figure 6F. **(B)** Proportional differences (symbolized as Δ , obtained by dividing EL by CL values for either NaCl or Gly condition are reported under the graph. **(C)** R0, R1, R2 proportions among live cells are depicted. **(D)** Proportional differences (symbolized as Δ , obtained by dividing EL by CL values for either NaCl or Gly condition are reported under the graph). Only significant proportional differences are underlined. (versus NaCl EL: * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$; versus Gly EL: ### $p < 0.01$, #### $p < 0.0001$). $N = 3-6$. **(E)** Representative dotplots depicting F4/80 expression in each of the 4 conditions (NaCl EL, NaCl CL, Gly EL and Gly CL) gated on 10 000 live CD45⁺ cells after doublet exclusion.



Supplemental figure 9. CD206 expression 30 days after glycerol injection. (A) Percentage of CD206⁺ cells in each macrophage subset 30 days after glycerol injection. **(B)** Percentage of CD206⁺ cells in live cells (obtained by adding CD206⁺ cells in R0, R1 and R2) 30 days after glycerol injection. Significant proportional differences (symbolized as Δ , obtained by dividing proportion by control (CTL)) are reported under the graph. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ and **** $p < 0.0001$ compared to control (CTL). # $p < 0.05$, ### $p < 0.001$ compared to Gly. N=3-9. Abbreviations: Gly refers to glycerol, CL refers to liposomal clodronate.



B.

Gene	Design RefSeq	Forward	Reverse	Gene	Design RefSeq	Forward	Reverse
Actb	NM_007393.3	CCCTAAGGCAACCTGTAAA	CAGCTGGATGGTACGTAC	Il10ra	NM_008348.2	AACCTGACACACCTGAGAC	GCCTTCAGAGTCACCTATCC
Arg1	NM_007482.3	GGATGGCAAGGATGGAA	CGACATCAAGCTCAGGTGAA	Il12b	NM_008352.2	ATCGTTTGGTGGTGTCTCC	GGAGTCAGTCCACCTCTAC
Bcl2l1	NM_007392.2	TTGTCAACAGCTGCTGAAC	GTTCCAGAACCTGGTCTTA	Il13	NM_008355.3	AGCTTATTGAGGAGTGAGCA	CCAGGTCCACCTCCTAC
Bcl2l2	NM_007472.2	AAATGCTGCTGCTGCTGA	CTTGTGGTGGTGGTGGAA	Il13a1	NM_008360.4	AGAGGACAAATGCCAATTC	AGAACACAGGAGGTGGAA
Bmp7	NM_007557.2	TGTATGTCAGCTTCCGAGAC	GTATAGGACAGTACCTTCA	Il17a	NM_010952.3	TGAGTCAGGAGAGCTTCA	CGCTGTGCTTCACTGTA
Cas1	NM_009807.2	AGGATCTGGGGTATACCGTGA	GGCAGCAGCAATCTTTTCA	Il17b	NM_008361.3	TGGCACTGTCTTGAACCTA	GGGTCTGCTCAATCTCAAGAAC
Ccl12	NM_011331.2	TCCGGAAGCTGAGAGCTAC	TTCTGGGACAGATCTCTTATCCA	Il1r1	NM_008362.2	TCTGCTCTGGTTGTCCCA	TCCCGAGGTCTTGGGATAA
Ccl2	NM_011333.3	AGCAGCAGGTGTCCCAA	TTCTGGGCTGAGCAGAC	Il22	NM_016971.2	TGTTGCTCTCTGACCAA	TCTGGATGTCTGTGCTGAC
Ccl5	NM_013653.3	GTGCCACGTCAGGAGTA	CGGTTCTTCCAGTGACA	Il23a	NM_031252.2	CTGATGCTAGCTGGGAA	ACTGTGATAGGGGACATTA
Ccl7	NM_013654.3	TTCTGCTGCTGCTGCTCA	CATAGCAGATGTGGATGCA	Il3ra	NM_008369.1	CTGTGCTGCTGCTGCTCA	AGTCTTCAAGAGCTGGTCC
Ccl9	NM_011336.2	GCACAGCAAGGCTTGAA	AGCAGCAGCAGATCTGAA	Il6	NM_012183.2	ACGGAGATGATGTGCAAA	GCACCTTGAAGGCTTCA
Ccr1	NM_009912.4	CTCAAGAGGCTCAGAAACA	CTCATCTTCTTGGAGAAC	Il6ra	NM_001008700.3	AACATCTCCAGAGAGCAACC	CTCAGCTGGGCTCTTCTGA
Ccr2	NM_009915.2	TGCCATCATAAAGAGCCATA	TAGCAGATGTGGTGAATCCA	Il6b	NM_013168.1	CCAGAACCGCTATGAGTTC	GTGTGACAGCATCAGTCC
Ccr5	NM_009917.5	GGAGGTGAGACATCCGTTC	GGTGGAACTGACCTTGA	Il6ra	NM_010559.2	GCAGGAATCTCTGGAAAC	GGACATCGTGTCTCTGTA
CD209a	NM_133238.5	GGCTCAACTGTGTCTATCA	ATGAGCCCATCCAAGTGA	Ilf1	NM_008390.2	TACCTGGTCAAGGCTGGATA	TCAGAGAGACTGCTGCTAC
Cd36	NM_00159555.1	GGTGTGCTAGACATTTGGCAA	GACTTGCATGTAGGAATGTGGAA	Ilf4	NM_013674.1	TCCCATTTGAGGCAAGCTA	CGAGGATGTCCCGGTAATACA
Cd86	NM_015188.3	CATGGGCTTGGCACTCTTA	CATGAAATAGGCTGTGCTCTCC	Ilf5	NM_012057.3	ATCTACGAGTCTGCTCCAA	TCTCTCTCTCTCCAGAAC
Chil3	NM_009892.2	GTCTGGCAATCTCTGACCTA	CTGCTCTTACGCCAATGGTA	Ilf7	NM_016890.2	GATCCGATAGGCTTACGAAC	TCTGAGGCTCACTTCTCC
Clec7a	NM_020008.2	ACCAAGGCTCAGAAATCA	AGGAGGCTCAGGCTGAGAA	Ilf8	NM_001082960.1	AAGCAGCTGATGGAGAGAC	GGCCCATGTTTGTGAAACA
Cmhr1	NM_008153.3	GTAACAGCAGCAGGAGAC	AGTCTGTTAAGGCTGATAC	Ilf8b	NM_008040.4	AGGCGTTTGAGAGAGAGAA	TCATGACCTGTTGCTGAGCA
Col1a1	NM_007742.3	TTACGGGAATGCCGTGGAA	ACCTTGGGACGAGTCA	Ilf8c	NM_010637.3	CAGGCTGTGGCAAACTATAC	CGTCCAGTACAGTGGTAA
Col3a1	NM_009930.2	TGCTGGAAAGATGGGGAGAC	GGTCCAGATCTCCCTGTGAC	Ilf9	NM_009769.4	TCTGGAGAGCCAGCTATCC	TGAGTCTCAGGTGAGCTTTAA
Col5a1	NM_009933.4	CGATGACGGCTTCTGAGAAC	TTGGACAGGTATATCCGGACAC	Ilf9b	NM_001039537.1	AGGCGCAATGCTCTCTCA	TAGGCGCAGATAGTCTTCCA
Col8a1	NM_007795.2	AATCCACTCTGCGCAAGAA	CGCAACTCTGTAAGGATAC	Ilf9c	NM_010336.2	AGTCTGAGCTCAGAGAGAA	CCGAGGCTCAGCAGCAATTA
Csf1	NM_00113529.1	CCACATATGGGAATGAGAC	GCATCTGCGATGAATCTCC	Ilf9d	NM_010741.2	GTGTGCAATCAGGAGTCT	CAGTGGGAACTGCTGCAATG
Csf1r	NM_001037859.2	GACTGGCTAGGACATGAA	TTGGGGCTCATCCATTAC	Ilf9e	NM_008607.2	AAACCTGGAACAGAGTTC	TCTTGGAGTATCAGCAACC
Csf2rb	NM_007780.4	CTCACTTCTGCTCTGATCC	GGTGGGATCTTTCTCTCCA	Ilf9f	NM_008068.3	CAAGGCTGATTTGGCAACCA	GGCTTATCATGATCCCAAC
Cxcl16	NM_010113.3	AGGAGACTCTGCTGATGCA	AGCAGCAGCACTATCTCA	Ilf9g	NM_008625.2	AAAGGCTATCTGGTGGAGAA	CTCTGTGATATGGCCACCA
Egr1	NM_010302.4	GCAGAACTCTCAAGTGTCA	AATCTGGCAATGGCTTGA	Ilf9h	NM_00113326.1	GACAGAGGCTTACTGGCAAA	AGCCAACTTCTCTCCGATCA
Egr2	NM_008813.3	GAAGGACTGGGCTGGATA	CTTCTACAGCTGCTTGTTC	Ilf9i	NM_008689.2	ACGCTGAGCTGTGTTCA	GTAGGCTGCTTCTCTGATCA
Entpd1	NM_009848.3	CTGTGCTATGGGAAGGATCA	TAAGAGGCTCAGCACTATGCA	Ilf9j	NM_013610.2	TCTCTCTGCTGCTGAGTAT	AGCCGGGTGTTGAGGTGTCA
Fcgr1g	NM_010185.4	GTCTTCTGCTCTTGTGGAA	GGACAGCATCTCAGGATATGCA	Ilf9k	NM_145827.3	TGCTCTGCAACTCAGAAA	AACCACTGAGATCTGAGCA
Fcgr2b	NM_010187.2	CTACGGACTTGTGGCATA	CATGAGTCCAGCAGCAA	Ilf9l	NM_010927.3	GAGGAGCAGGTGGAGACTA	GGAAAAGACTGACCCGAGATA
Fcgr3	NM_010188.5	TCAGAAATGCACTCTGAA	ACTCTGCTCTGTGCAAA	Ilf9m	NM_001038839.1	CAGCAATATGGCAGCTGCA	GCCTTATCGTCAACCAAGCA
Fcrlb	NM_010707.3	AGTGAAGTGTGACCTGCA	CTCTACGCTCTCTGCA	Ilf9n	NM_013785.2	TGTACAGGCTCAGGATTC	CAGCTGTGATGATCTCTCA
Fgf10	NM_008002.4	GGGGGACAGAAATGAAGAC	GTGCTGTGATGGCTGTGAC	Ilf9o	NM_008907.1	AGGGTCTCTCTCTCAGAAA	TGCCTGAGTGTGCTTCA
Fln	NM_010233.1	CGTCACTGCTTGAAGAA	AGGGTATACAGGTTGGGAA	Ilf9p	NM_013258.2	GAGGAGCTCAAGCAGTAA	TGTACTCTGAGCAGGACAA
Gapdh	NM_008084.2	AGAGGCTCGCATCTCTT	TTACACAGGCTTCAACAT	Ilf9q	NM_181596.4	TATACAGGCTTCAAGCAGAC	ATCCACAGCATATGCGCAAC
H2-aa	NM_010378.2	AGGAGCGGCTCTGAAACAC	ACAGGCCACAGCAGAAC	Ilf9r	NM_011347.1	ATGGAAATGCCCTTGAAAC	AAAGGGCTTGGCTATATGCA
Hgf	NM_010427.4	CATCAATGCTAGGCTGAA	TTCTTACGCGATAGCTGAA	Ilf9s	NM_009283.3	GCAGGTGTTGTATGAGTCAAC	ATGACGGCTGCTGCTTCTA
Hprt	NM_013556.2	CAGTACAGGCCCAAAATGGTA	AGTCTGCTGTATCTCA	Ilf9t	NM_213659.2	TGGGCTATCTCTCTGTGTA	CCAAATGGGCTTATGTA
Il6	NM_008337.3	GGCAGATATTGAAGCTTA	GCCATCTCTCAGATATCCA	Ilf9u	NM_009284.2	TGACTTCTCAAGCTTCA	CATCTGAGCAGCAGGAC
Ilf1g	NM_010511.2	CTGGGAATCAGAAATGTCA	TGCAAGAACTAGTCCAGAA	Ilf9v	NM_011199.3	GCCAGGCTTGGAGTCA	GGGCACTTGTGAGGTGAGAC
Il30	NM_010548.2	AAAGGACAGCTGGCAACA	TAAGGCTTGGCAACCAAGTA	Ilf9w	NM_009637.3	GCCCATATCTAGGATCTCAGCA	AGGCGAGCTTGGGATTTA
Ilf1b	NM_009368.3	TCAGGCTTCCGCTATAC	CTCTGGGTTCAGGTTGTGTA	Ilf9x	NM_011905.3	TGCTACAGGCTCAGAAAC	AGCCAAAGAGCTGATAGCA
Ilf2	NM_011905.3	TGCTACAGGCTCAGAAAC	AGCCAAAGAGCTGATAGCA	Ilf9y	NM_021297.2	GTCTCTCTCTGCTGATAC	GCTGAGTTTCTGATCTGCA
Ilf4	NM_021297.2	GTCTCTCTCTGCTGATAC	GCTGAGTTTCTGATCTGCA	Ilf9z	NM_013693.2	CAAAATGGCTCTCTCTATCA	TGGGCTACAGGCTTGTGAC

Supplemental figure 10. Single-cell protocol technical aspects. (A) Purity of FACS-sorting. (B) Primer design for 96 genes qPCR.

Symbol	Design RefSeq	Sequences		Gene name
		Forward	Reverse	
GAPDH	NM_008084.2	CTT TGT CAA GCT CAT TTC CTG G	TCT TGC TCA GTG TCC TTG C	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
PPIA	NM_008907	GCAGACAAAGTTCCAAAGACAG	CAT TAT GGC GTG TAA AGT CAC C	Peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A)
18S	NR_003278	AGCCTGCCGCTTAATTGAC	CAACTAAGAACGGCCATGCA	18S ribosomal RNA
ACTB	NM_007393.3	ACCTTCTACAATGAGCTGCG	CTGGATGGCTACGTACATGG	Actin, beta
Ccl7	NM_013654.3	TCT CTC ACT CTC TTT CTC CAC C	GGG ATC TTT TGT TTC TTG ACA TAG C	Ccl7
Ccl2	NM_011333.3	GTC CCT GTC ATG CTT CTG G	GCT CTC CAG CCT ACT CAT TG	Ccl2
Coll III	NM_009930	ACGTAGATGAATTGGGATGCAG	GGGTTGGGCAGTCTAGTG	Collagen III
Fn1	NM_010233	ATGTGGACCCCTCCTGATAGT	GCCAGTGATTTCAGCAAAGG	Fibronectin 1
Hmox1	NM_010442.2	CAGTCTATGCCCACTCTAC	ACCAGGAGCTCAGGGTGAGT	Heme oxygenase 1
NLRP3	NM_145827.3	GAGTTCTT CGCTGCTATGT	ACCTTCACGTCTCGGTTTC	NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3
CD206	NM_008625	CAAGGAAGGTTGGCAATTGT	CCTTTCAGTCCTTTGCAAGC	Mannose receptor
Il1b	NM_008361	TGTGAAATGCCACCTTTTGA	TGTCCTCATCCTGGAAGGTC	Interleukine 1 beta

Supplemental figure 11. qPCR technical aspects. Primer design.

Appendix. P-Values for single-cell analysis (2 pages).

6. Discussion & Perspectives

Ce travail nous a permis de mettre en évidence que la physiopathologie de la néphropathie liée à la rhabdomyolyse n'impliquait pas seulement la myoglobine en tant qu'agent toxique pour le tubule, mais aussi le recrutement du système immunitaire inné, notamment les macrophages (Mø). Nous allons mentionner les questionnements restants pour compléter ces données et quelles stratégies pourraient être mises en œuvre afin d'y répondre. Schématiquement, nous avons distingué des questionnements d'ordre physiopathologiques, cliniques et thérapeutiques. Nous rappelons en préambule que les dénominations R1 et R2 se réfèrent aux cellules décrites dans le rein *in vivo*, et que M1 et M2 se réfèrent aux phénotypes théoriques décrits dans la littérature *in vitro*.

6.1 Questionnements physiopathologiques

6.1.1 Ontogénie des R2 huit jours après la rhabdomyolyse

6.1.1.1 Limites de l'étude

Notre étude s'est limitée à la description de l'apparition des populations de Mø dans le temps, sans faire de lien ontogénique entre elles. Nous observons majoritairement des R1 (pro-inflammatoires, délétères) à J2, et des R2 (exprimant des marqueurs de réparation tel le CD206) à J8. Cependant nous n'avons pas de données ni sur la provenance, ni sur le devenir de ces cellules aux temps étudiés.

6.1.1.2 Hypothèses émises

Les R2 résultent d'une reprogrammation transcriptionnelle des R1

Les R2 observés en phase de réparation rénale (J8) pourraient résulter de la conversion des R1 présents en phase initiale inflammatoire (J2), tel que cela a été montré dans le rein après I/R [97], ainsi que dans le muscle[215]. Le marqueur Ly-6B indiquant la provenance monocyttaire des Mø n'est pas suffisant pour répondre à la question: les R1 à J2 sont Ly-6B^{hi} donc semblent dériver des monocytes ; les R2 à J8 sont Ly-6B^{lo} donc semblent être dans le tissu depuis plus longtemps, mais ceci n'exclut pas une perte progressive du marqueur entre J2 et J8. L'étude transcriptionnelle, qui révèle que les R1 ne sont pas de « purs » M1, puisqu'ils expriment des marqueurs M2 (i.e. *Chi3l3*), est insuffisante car réalisée à J2 exclusivement.

Un argument qui va contre l'origine R1 des R2 est le résultat bénéfique du traitement par clodronate. En effet, si les R1 étaient la source des R2, nous devrions avoir des lésions tardives plus importantes avec le CL puisque l'on empêcherait la génération de R2. Or le CL est néphroprotecteur.

Une repopulation par des R2 depuis le contingent sanguin à J6

Une autre possibilité est le recrutement direct de monocytes depuis le compartiment sanguin en phase tardive, formant les M2 « réparateurs », indispensables à la régénération tissulaire. Nous avons donc réalisé un traitement par CL à J6 et J7 après rhabdomyolyse, et aucune aggravation n'a pu être notée, indiquant que la phase de réparation rénale se fait avant 7 jours. Fait notable, la proportion de R2 à 1 mois est plus faible après utilisation de CL tardif qu'après utilisation de CL précoce (**voir Annexe n°1**). Nous ne pouvons déterminer si ceci est dû à une déplétion des R2 résidents ou une réduction des précurseurs monocytaires.

Un changement phénotypique des R2 résidents

Enfin, les R2 à J8 pourraient résulter d'un changement phénotypique des R2 résidents, qui étaient présents à J0. Selon cette hypothèse, les R1 de la phase inflammatoire, qui ne sont plus détectables à J8, auraient disparu (mort cellulaire, ou relocalisation en dehors du rein). Les R2 à J8 seraient les R2 de J0 avec des caractéristiques différentes, notamment l'expression du CD206.

6.1.1.3 Approches envisagées

Pour faire la part entre ces possibilités, la déplétion seule par CL n'est pas la bonne approche. Des expériences de transferts adoptifs pourraient apporter des réponses. En déplaçant les souris avec du CL, et en les ré-injectant avec des monocytes marqués avec du Pkh26 (colorant fluorescent des cellules phagocytaires, utilisable *in vivo* 21 jours), on pourrait suivre le devenir des cellules et leur contribution dans la génération de populations tissulaires tardives. Un marquage associé avec du CFSE (marqueur de prolifération, dont la fluorescence diminue au fur et à mesure que la cellule mère donne naissance à des cellules filles) serait très informatif pour établir le caractère proliférant ou non des cellules s'infiltrant dans le rein.

Une autre possibilité serait l'utilisation de chimères CD45.1/CD45.2. Le CD45 existe en effet sous deux formes fonctionnelles: 45.1 et 45.2. En injectant des cellules de moelle osseuse provenant de souris CD45.1 à des souris receveuses CD45.2, on pourrait évaluer le pourcentage de cellules CD45.1 dans l'infiltrat CD45.2 observé à J8.

Enfin, il existe des modèles génétiques de suivi de lignée cellulaire, qui permettent d'identifier des cellules ayant partagé un progéniteur commun. La construction fait appel à un gène rapporteur (type LacZ ou EGFP), un promoteur spécifique d'une activité macrophagique (type lysozyme, Csf-1r, Cx3cr1, Ccr2, Cd11c) et une recombinaison (Cre). Dans les cellules où le promoteur est activé, la Cre s'exprime, et le gène rapporteur est exprimé de manière irréversible. Les cellules vont continuer à exprimer le gène rapporteur, même si elles se différencient et si le promoteur spécifique d'activité est

éteint. On peut donc identifier avec le rapporteur si les cellules dérivent d'un progéniteur ayant subi une recombinaison.

6.1.2 Effet différentiel du CL

6.1.2.1 Limites de l'étude

De manière surprenante, R1 et R2 ne semblent pas avoir la même sensibilité au CL. Alors que l'effet du CL est surtout visible pour les R2 en condition homéostatique, il devient prédominant sur les R1 en condition d'inflammation. De plus, le traitement par CL déplete les R1 à J2, et renforce un contingent de cellules CD206 à 1 mois. Ceci suggère que le CL pourrait « épargner » une population néphroprotectrice, tel que cela avait été observé par Ferenbach[128]. Malheureusement, nous n'avons pas inclus d'étude de la fonction phagocytaire dans notre caractérisation des R1 et des R2. Seule l'expression de certains récepteurs membranaires (Fcgr3, Fcgr1g, CD86) a été étudiée lors de l'étude transcriptionnelle, et n'était pas significativement différente entre R1 et R2 (voir figure 5 du manuscrit).

6.1.2.2 Hypothèse émise

Les R2 sont moins sensibles au CL que les R1. Les cellules R2 ont-elle des capacités de phagocytose différentes des R1 ? Il a en effet été décrit que les capacités de phagocytose des Mø étaient étroitement dépendantes de leur état de polarisation. Entre autres, il est connu que les facteurs polarisant vers M1 (IFN γ et LPS) retardent la cinétique de formation du phagosome, et que les facteurs polarisant vers M2 (IL-4) accélèrent la transition du phagosome vers le phagolysosome. Les M1 phagocyteraient « moins vite » que les M2[216]. Les cellules R2 auraient donc un comportement de M1 vis-à-vis du CL.

6.1.2.3 Approches envisagées

Pour tenter de répondre à cette question, nous avons mis au point une étude des capacités de phagocytose des Mø *in vitro* à l'aide de liposomes fluorescents et de mesure de la mortalité cellulaire après exposition au CL. Sur des Mø péritonéaux, nous retrouvons l'information selon laquelle la polarisation M1 rend les cellules plus résistantes au CL, dans la mesure où ces cellules sont moins fluorescentes en présence de liposomes fluorescents, et présentent une mortalité moindre après une exposition de 16 heures au CL (voir Annexe n°2). Il serait intéressant de refaire cette expérience non plus sur des Mø péritonéaux, mais sur les fractions de cellules R1 et R2 triées du rein, en condition homéostatique ou pathologique (après rhabdomyolyse).

Nous avons vu plus haut (paragraphe 3.2.3.1) que les Mø exprimant le CD206 étaient épargnés par le CL dans l'étude de Ferenbach[128], ce qui suggérerait soit une résistance de ces cellules en matière de

phagocytose, soit une accessibilité moindre au CL en raison de niches environnementales. Nous aussi avons retrouvé le fait que les animaux traités par CL avaient une proportion plus élevée de CD206 un mois après rhabdomyolyse. Une approche intéressante serait de soumettre des Mø de souris invalidées génétiquement pour le CD206 et attester leur résistance au CL par comparaison à des souris sauvages. Enfin, soumettre ces animaux CD206-KO à une rhabdomyolyse et observer des lésions rénales plus sévères (en raison de la moindre capture du collagène extra-cellulaire par le CD206) serait une démonstration du rôle protecteur de cette population de Mø.

6.1.3 Lien entre la lésion musculaire et l'ARA

Même si le modèle de rhabdomyolyse induite par le glycérol est largement utilisé dans de nombreuses publications, il a comme chaque modèle ses inconvénients. Plusieurs problèmes sont soulevés par le fait que l'ARA dans ce modèle de rhabdomyolyse résulte d'une lésion à distance de l'organe rénal, donc indirecte. Le glycérol est-il un agent myolytique ou néphrotoxique ?

6.1.3.1 Hypothèse émise

Le diagnostic différentiel de la néphropathie post-rhabdomyolyse induite par le glycérol reste la néphropathie liée à la toxicité du glycérol. Un travail a montré qu'une injection intra-péritonéale de glycérol suivie de 24 heures de restriction hydrique s'accompagnait d'une insuffisance rénale aiguë chez le rat [217]. Le glycérol injecté dans le muscle pourrait donc être résorbé, passer dans la circulation systémique et altérer le rein, sans rhabdomyolyse associée.

6.1.3.2 Approches envisagées

Plusieurs précautions ont été prises afin d'invalider cette hypothèse. La première était la vérification de l'induction d'une authentique rhabdomyolyse sur les critères biochimiques plasmatiques (dosage des CK). La seconde était de réaliser le dosage plasmatique du glycérol après injection de glycérol. Les valeurs obtenues sont les suivantes : souris contrôles à 434,67 μM \pm 39,27 et souris injectées en glycérol 192,17 μM \pm 44,78 (n=3 par groupe, valeurs normales =160-470 μM), ce qui indique que l'injection intra-musculaire de glycérol ne s'accompagne pas d'une augmentation de la glycérolémie dans nos conditions. Enfin, si la détection de la myoglobine avait été aisée, nous aurions pu la mettre en évidence sur des coupes immuno-histochimiques, et ainsi prouver qu'il y avait bien une rhabdomyolyse.

En remplacement du glycérol, on pourrait provoquer la rhabdomyolyse par d'autres méthodes (e.g. physiques : lésion musculaire liée à l'application de froid [218]), ou injecter de la myoglobine directement dans la circulation sanguine pour simplifier le modèle.

6.1.4 Rôle de la myoglobine en tant qu'antigène

6.1.4.1 Limites de l'étude

Notre travail n'a pas porté sur la description des effets mécanistiques de l'exposition des Mø à la myoglobine. Nous avons pu préciser que la myoglobine était un signal de danger pour l'épithélium tubulaire, qui envoyait des messagers pour recruter les Mø (CCL2, CCL7), et un signal de danger pour les Mø, péritonéaux ou rénaux, qui enclenchaient des réponses précoces (expression génique à 4 h montrant une surexpression de marqueurs anti-inflammatoires HO-1, CD206, et pro-inflammatoires IL-1, Nlrp3). Cependant, nous n'avons pas réalisé d'étude sur cellule isolée sur ces Mø traités *in vitro* avec la myoglobine, ni étudié les phénomènes systémiques en amont du tissu rénal.

6.1.4.2 Hypothèse émise

La myoglobine sanguine pourrait sensibiliser et activer les monocytes circulants. La myoglobine pourrait être reconnue comme une protéine immunogène par le système immunitaire, notamment les monocytes. Une réaction de type antigène-anticorps pourrait avoir lieu, telle que celle décrite dans des études historiques où la myoglobine sert d'agent immunisant [219], donner des complexes-immuns circulants qui expliqueraient la polarisation M2b des R2 observés.

6.1.4.3 Approches envisagées

La première étape serait de décrire le profil du système MPS circulant et non plus rénal, en effectuant une numération formule sanguine des souris après rhabdomyolyse, en établissant un phénotype CD11b F4/80 Ly6C Ly6B, et en étudiant les modifications transcriptionnelles associées (notamment la voie du CD163, Nrf2). Même si résumer la rhabdomyolyse à l'effet de la myoglobine est faux, il serait intéressant d'identifier si ce type de processus a lieu ou non.

6.1.5 Les macrophages, cellules parmi tant d'autres

6.1.5.1 Limites de l'étude

Nous avons fait le choix de nous focaliser sur les Mø et pas sur les autres cellules du système immunitaire. La définition de notre schéma n'a pas permis l'étude des populations autres que celles du MPS, dans la mesure où le panel de marqueurs choisis (F4/80, CD11b, Ly6G, Ly6b, CD206, CD209) s'orientait déjà vers ces cellules. Nous avons privilégié une sélection positive à une sélection négative (expression de certains marqueurs plutôt qu'absence d'expression), qui offrait l'avantage de

permettre un tri plus aisé. La contrepartie est que nous avons comme seule information « non macrophagique » la population de CD45 globaux qui comprend tous les leucocytes.

6.1.5.2 Hypothèses émises

Les mastocytes sont présents de manière ubiquitaire dans l'organisme et jouent le rôle de sentinelle dans la défense de l'hôte. Leurs capacités à produire des facteurs pro-fibrotiques (TGF- β), à activer le système de l'angiotensine II *via* un mécanisme dépendant de la chymase en font des cellules importantes. L'analyse de biopsies rénales fait état d'une corrélation entre l'accumulation de mastocytes et le degré de fibrose tubulo-interstitielle, mais leur rôle n'est pas encore bien connu [44]. Il est possible que ces cellules jouent également un rôle dans notre modèle. De même, l'infiltration de lymphocytes T a été documentée dans la plupart des maladies rénales chez l'homme ou l'animal. Une fois activés dans le parenchyme rénal, ces cellules peuvent produire des chimiokines et cytokines, induire le recrutement du système monocytaire et amplifier la réponse immune. Une étude récente montre l'importance des réponses T_H2 dans la fibrose secondaire à une OUU [220]. Les lymphocytes T pourraient également être impliqués dans la régulation de la différenciation de cellules hématopoïétiques en fibrocytes[221], et participer activement à la sécrétion de TGF- β .

6.1.5.3 Approches envisagées

Il nous faudrait donc réitérer le phénotypage avec des marqueurs membranaires dédiés à l'étude des autres cellules du système immunitaire. L'étude de la composante adaptative du système immunitaire permettrait notamment de savoir si une mémoire peut être mise en place dans une situation de rhabdomyolyse répétée. L'étude des ganglions lymphatiques péri-rénaux indiquerait si les M ϕ et/ou DCs observés sont impliqués dans des phénomènes de présentation d'antigènes. On pourrait également concevoir une co-culture de M ϕ R1 avec des lymphocytes T pour évaluer la capacité des M ϕ à stimuler la prolifération lymphocytaire.

Au-delà de ces interrogations fondamentales, il nous paraissait important de resituer l'impact des données dans un registre plus pragmatique qu'est celui de la néphrologie clinique.

6.2 Questionnements cliniques

6.2.1 Pertinence du ratio M1/M2

Nous avons vu que l'état de polarisation des Mø était un déterminant fort de l'évolution des lésions rénales dans la situation de rhabdomyolyse. Dans plusieurs publications déjà, les auteurs utilisent le ratio M1/M2 afin de présenter l'état de polarisation des Mø du rein : un ratio M1/M2 élevé traduit un état pro-inflammatoire. Jusqu'à présent, aucune donnée n'établit de lien entre ce ratio et la fonction rénale.

6.2.1.1 Le ratio R1/R2 est corrélé à la fonction rénale

Le ratio R1/R2 est environ à 0,2 en condition de rein normal. Après rhabdomyolyse, à J2, la valeur atteint 5,4 et le traitement par CL diminue significativement la valeur à 1,1. A J8, le ratio est de 0,4. Nous avons donc évalué la possibilité d'une corrélation entre le ratio et la fonction rénale estimée par l'urée plasmatique. Le ratio R1/R2 est positivement associé à l'urée plasmatique, de manière significative ($r=0,7$; $p<0,0001$; voir annexe n°3). Il est important de souligner que le rôle délétère des Mø R1 n'est pas établi sur cette corrélation qui est uniquement descriptive, mais bien par les expériences de déplétion.

6.2.1.2 Intérêt clinique du ratio R1/R2

En clinique, ce ratio ne semble pas avoir d'intérêt diagnostique dans la mesure où il n'est pas nécessaire de conduire des explorations poussées sur le sous-type de Mø pour conclure à une insuffisance rénale. Par contre, cela pourrait être d'un intérêt thérapeutique pour surveiller l'état inflammatoire du rein de manière longitudinale, et plus finement qu'avec les marqueurs fonctionnels. Le typage M1/M2 pourrait être réalisé, par histologie, sur des biopsies itératives et cette valeur serait un indice de l'efficacité du traitement immunologique en cas de facteurs néphrotoxiques confondants (i.e. produit de contraste, hypercalcémie).

6.2.2 Composante hypovolémique dans le modèle expérimental

Dans l'explication classique de la physiopathologie de la rhabdomyolyse, les phénomènes d'hypovolémie ont toujours été prépondérants. A l'atteinte organique par la myoglobine s'ajoute une atteinte fonctionnelle, suite au troisième secteur constitué dans le muscle et la vasoconstriction rénale. C'est pourquoi la réhydratation précoce reste à ce jour le traitement de référence de cette ARA.

Notre modèle a permis l'étude de l'implication des Mø dans la maladie mais nous n'avons aucune idée de la part respective de chacun des phénomènes (inflammation *versus* hypovolémie) dans la sévérité de la pathologie.

6.2.2.1 Difficultés liées à l'utilisation des indicateurs plasmatiques

Du point de vue méthodologique, la mesure de créatinine est décriée chez la souris, pour des raisons techniques d'interférence de dosage colorimétrique. Nous avons complété la documentation de l'effet néphroprotecteur du CL par une estimation du DFG par la méthode de l'inuline-FITC. Nous n'avons donc pas pu utiliser le rapport urée/créatinine tel que c'est fait chez l'homme pour statuer sur l'aspect fonctionnel de l'ARA.

6.2.2.2 Mineure par rapport à l'inflammation

Nous avons réalisé un protocole dans lequel des souris étaient soumises à une rhabdomyolyse, et réhydratées ou non avec du sérum salé isotonique (à raison de cinq injections de 500 µL en intra-péritonéal à H6, H24, H32, H48, H56). Ce traitement n'a été suivi d'aucun effet : nous n'avons pas observé de réduction de la mortalité ou de l'insuffisance rénale, au contraire du traitement par CL. Ceci est un argument en faveur d'une faible part d'hypovolémie dans les lésions étudiées.

6.2.2.3 Majeure par rapport à l'inflammation

Les souris ayant subi une rhabdomyolyse sont sensibles aux prélèvements sanguins.

A l'inverse, les souris soumises à une rhabdomyolyse ont montré une fragilité excessive en situation de prélèvement sanguin. Nous avons mené un protocole avec des prises de sang de faible volume (15-20µL de sang total) mais fréquentes pour une cinétique. Alors que ces analyses itératives étaient sans effet sur la survie ou la fonction rénale dans le groupe témoin, nous avons noté une surmortalité dans le groupe rhabdomyolyse, indépendamment du CL. Il semblerait donc que la spoliation sanguine puisse aggraver la part d'hypovolémie existante chez les souris, et prendre le pas sur les phénomènes immunologiques.

Une polyurie semble protéger des lésions d'ARA induites par la rhabdomyolyse.

Un autre élément est l'observation d'un effet néphro-protecteur attribuable à un *wash-out*. Le fait de réhydrater massivement les patients s'accompagne de l'induction d'une « diurèse forcée », qui pourrait prévenir la précipitation de la myoglobine sous forme de cylindres, et faciliter son élimination. Nous avons donc pratiqué une rhabdomyolyse chez des souris en situation de polyurie dans le cadre d'un diabète sucré décompensé (modèle de diabète induit par la streptozotocine ou modèle génétique

Ins2Akita). A noter que ces souris présentent une diurèse nocturne de 20 mL contre une normale à 2 mL. De manière très surprenante, les souris diabétiques résistent à la rhabdomyolyse : la fonction rénale, conservée initialement, est moins altérée après injection de glycérol. Les lésions rénales observées semblaient également moindres à J3 dans les souris Ins2Akita comparées aux souris sauvages. Pour le moment ces résultats préliminaires demandent à être confirmés, et le fait que ces souris soient protégées par un élément lié au diabète plus qu'à la polyurie reste à déterminer.

Quid de la restriction hydrique dans le modèle expérimental ?

Dans notre modèle, les souris ont eu accès à la boisson *ad libitum*, et la rhabdomyolyse était suivie d'une mortalité importante (50% des effectifs). Ces données sont concordantes avec des données préalables [203]. Au contraire, d'autres auteurs pratiquent une restriction hydrique pendant seize heures, suivie de l'injection de glycérol, et n'observent aucune mortalité au bout de six jours [176]. Malheureusement on ignore si les boissons sont ré-introduites ou non au terme des seize heures. Si oui, il pourrait se produire un effet *wash-out* par reprise de l'hydratation, ce qui expliquerait une meilleure survie que dans nos conditions.

6.2.2.4 Approches envisagées

Une approche complémentaire pour résoudre cette contradiction serait de réaliser une surveillance invasive des paramètres hémodynamiques des souris après rhabdomyolyse, ce qui donnerait accès aux informations sur la perfusion rénale et l'état d'oxygénation. La réalisation d'un bilan hydrique individualisé de type entrées-sorties en cage métabolique serait également informative pour appréhender la diurèse de manière plus fine. Enfin, une analyse des fonctions tubulaires (électrophorèse urinaire, fraction d'excrétion du sodium) pourrait renseigner sur la part fonctionnelle de l'ARA.

6.2.3 La rhabdomyolyse à l'origine de lésions silencieuses de fibrose

Un des enjeux est de disposer d'un modèle expérimental de MRC. La majorité des études porte sur des temps d'analyse courts. Même les modèles de maladie chronique (dont le prototype est l'OUU pour la fibrose) sont rarement étudiés au-delà de plusieurs semaines. Depuis peu, le lien entre ARA et MRC est identifié. Des études prolongées commencent à apparaître, comme le travail récent montrant l'intérêt de la spironolactone dans la néphroprotection 270 jours après I/R [222]. Certes ces études sont contraignantes en matière d'infra-structure et de logistique (temps de séjour dans les animaleries, risque d'agressivité entre les souris, nécessité d'effectifs plus larges en cas de mortalité accidentelle), mais elles semblent pertinentes et riches d'informations. En effet, aucune donnée n'indique la correspondance temporelle entre une ARA chez l'homme et une ARA chez le rongeur mais, si l'on attend plusieurs mois pour observer un phénotype rénal, ceci est sûrement plus physiologique qu'une fibrose accélérée médicamenteuse sur quelques jours.

6.2.3.1 La rhabdomyolyse : un modèle de fibrose, mais pas de MRC

Sept mois après rhabdomyolyse, le phénotype des souris était le suivant, concernant :

- *l'état général* : les souris ayant eu une rhabdomyolyse avaient un profil pondéral très différent des contrôles. En effet, l'épisode d'ARA initial s'est accompagné d'une réduction dans la prise pondérale habituellement notée, ce qui fait que les animaux au bout de sept mois avaient un poids significativement inférieur. Nous avons mené une étude métabolique sur ces animaux, et mis en évidence que la rhabdomyolyse avait entraîné une réduction de la masse grasse des souris, qui étaient logiquement plus sensibles à l'insuline. Le CL n'a pas eu d'effet sur ces paramètres **voir annexe n°4**.
- *le métabolisme* : les paramètres classiques de la MRC ont été examinés, sans révéler de modifications à long terme après la rhabdomyolyse (protidémie, albuminémie, ferritinémie, magnésémie, phosphorémie).
- *la fonction rénale* : seule la mesure de l'urée était significativement modifiée, en faveur d'une MRC très légère chez les animaux sept mois après rhabdomyolyse : valeur de 12 mmol/L (contre 8 mmol/L chez les contrôles), partiellement corrigée par le CL (8,9 mmol/L). Alors que l'estimation du DFG par la méthode de l'inuline mettait en évidence une atteinte de la fonction de filtration à un et trois mois, cette dernière était normalisée au bout de six mois. Nous avons donc conclu que la fonction rénale de ces souris sept mois après rhabdomyolyse était sub-normale.
- *la structure rénale* : par contre, nous avons constaté des lésions de fibrose tubulo-interstitielle à type de dépôt de collagène, un aspect bosselé et atrophique du rein (**voir annexe n°5**).

L'ensemble de ces données suggère qu'une ARA peut donner des séquelles infra-cliniques qui sont toujours observables dans un modèle murin au bout de sept mois. Une approche intéressante aurait été d'exposer ces souris à un second épisode d'ARA, et lever leur susceptibilité à développer une authentique MRC.

6.2.3.2 Perspectives cliniques

A ce jour on peut regretter qu'il n'y ait pas de suivi systématique des patients après un épisode de rhabdomyolyse. Pour les situations de *crush-injury* liées aux séismes, les contraintes sont logistiques. Par contre, pour les situations d'accident médicamenteux, de traumatisme de la voie publique, ou d'exercice physique intense, le suivi néphrologique n'est pas forcément déclenché.

En pratique la réalisation:

- d'une biopsie rénale dans les situations d'ARA anurique et/ou sévère permettrait d'avoir une idée pronostique, et documenterait le parallélisme possible entre les données obtenues dans le modèle expérimental murin et les données humaines.
- d'une mesure du DFG à distance de l'ARA permettrait de dépister des atteintes chroniques.

Il faudrait donc mener une étude clinique prospective, multicentrique, décrivant la fonction rénale à long terme chez les patients admis pour rhabdomyolyse.

6.3 Questionnements thérapeutiques

Nous avons vu qu'il restait encore beaucoup d'interrogations sur la responsabilité des Mø dans les lésions rénales induites par la rhabdomyolyse, et la translation immédiate à la clinique est délicate. Comme souligné dans le chapitre d'introduction, la balance bénéfice-risque n'est pas en faveur de l'initiation de protocoles thérapeutiques en complément des recommandations de réhydratation. Le fait de savoir que cette maladie implique le système des Mø est intéressant du point de vue conceptuel, et permet de suggérer des interventions ciblées, qui pourront être appliquées à des ARA d'autre origine.

S'il fallait suggérer un médicament candidat découlant de ce travail expérimental, deux classes de médicaments seraient envisagées.

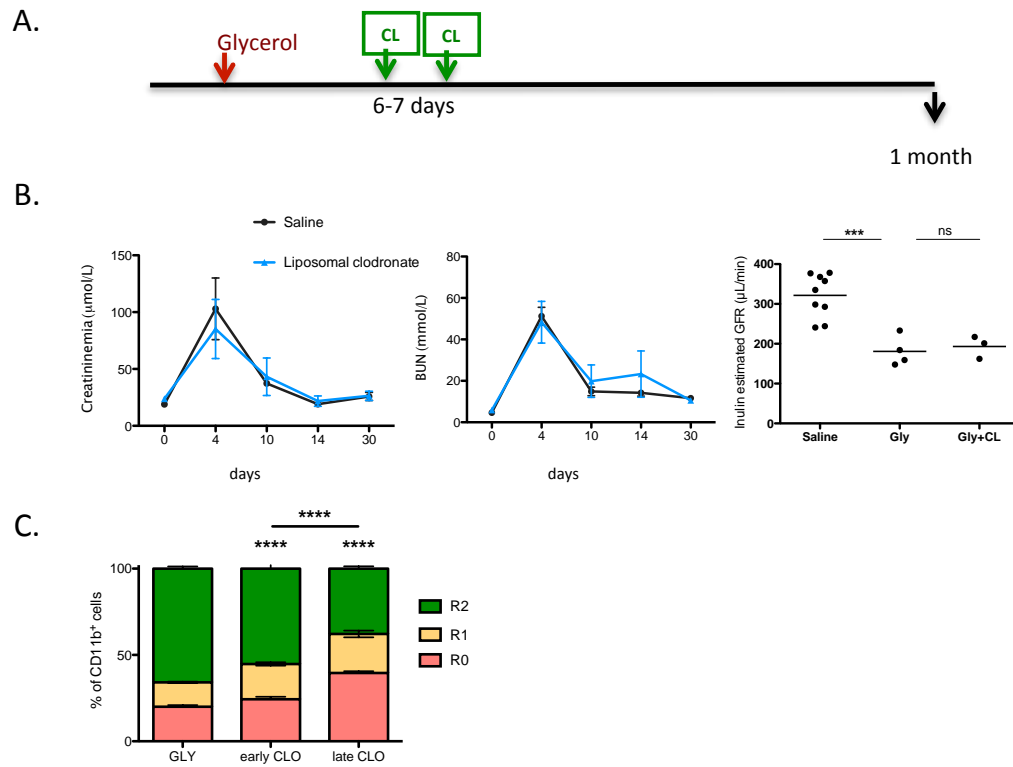
6.3.1 Les bloqueurs du recrutement

Nous avons vu des Mø R1 qu'ils exprimaient Ccr2, le récepteur de CCL2. Les molécules citées plus haut (paragraphe 3.3.3.1) pourraient être utilisées dans cette situation.

6.3.2 Les corticoïdes

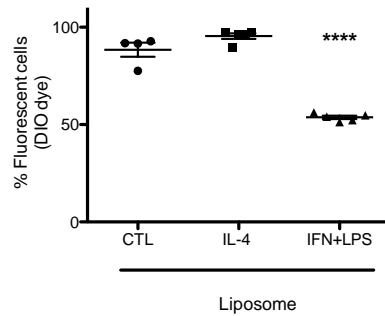
Moins spécifiques mais mieux connus car utilisés depuis bien longtemps, les corticoïdes en tant qu'agents immunomodulateurs pourraient être bénéfiques dans cette indication. Un travail expérimental démontre un effet protecteur de la dexaméthasone (0.1 mg/kg) [184].

6.4 Annexes

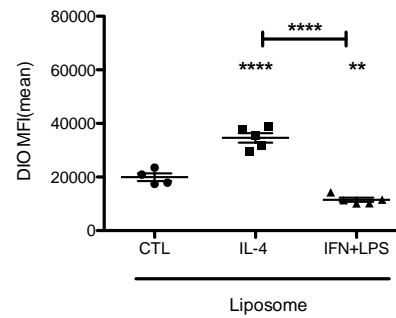


Annexe 1. Protocole de déplétion macrophagique en phase tardive de la rhabdomyolyse. (A) Schéma du protocole. **(B)** Evolution de la fonction rénale sur les paramètres biochimiques: créatinine, urée plasmatiques en fonction du temps et estimation du débit de filtration glomérulaire par la méthode de l'inuline-FITC 30 jours après la rhabdomyolyse (** $p < 0.001$). **(C)** Répartition des cellules monocytaires et macrophagiques selon les 3 régions : F4/80^{CD11b}⁺ (R0), F4/80^{low}CD11b^{high} (R1), et F4/80^{high}CD11b⁺ (R2) dans 3 groupes étudiés: rhabdomyolyse seule (Gly), traitement précoce par clodronate (early CLO), et traitement tardif par clodronate (late CL) (** $p < 0.0001$ comparé à Gly, N=3-5).

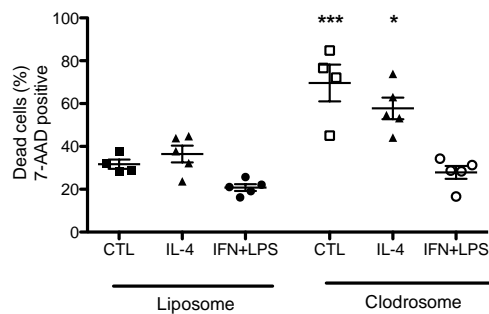
A.



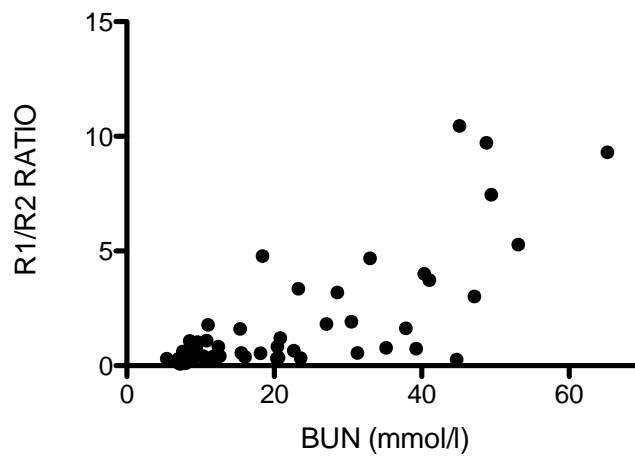
B.



C.

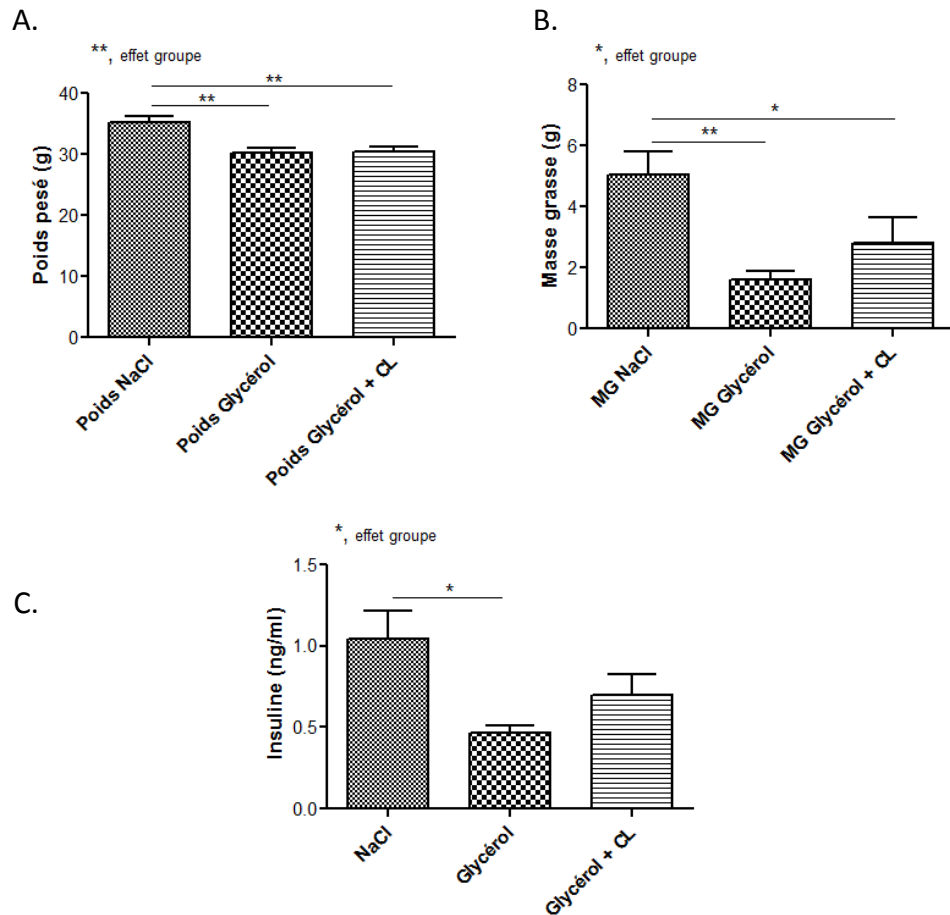


Annexe 2. Influence de la polarisation des macrophages sur leur capacité à phagocyter des liposomes et sur la mortalité induite par le clodronate. Des macrophages péritonéaux sont isolés dans des souris contrôles, polarisés in vitro pendant 24h vers le phénotype M1 avec IFN γ (20ng/mL) combiné à du LPS (1 μ g/mL) ou M2 avec IL-4 (20ng/mL), puis incubés en présence de liposomes vides fluorescents (50 μ g/mL DIO-fluorescent empty liposomes) ou non fluorescents mais contenant du clodronate. (A) Pourcentage de cellules fluorescentes. (B) Intensité moyenne de fluorescence. (C) Taux de mortalité cellulaire attesté par la fluorescence en 7-AAD. N=5-6 souris, * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$ **** $p < 0.0001$. Une polarisation vers M1 réduit les capacités de phagocytose des macrophages et la mortalité induite par le clodronate.

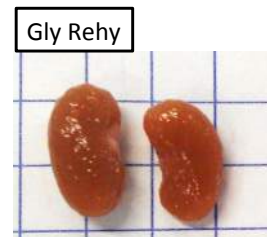
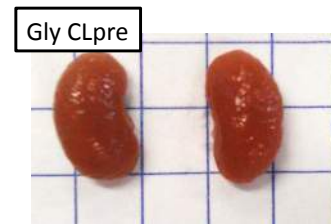
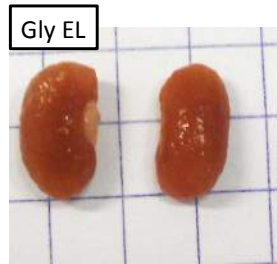
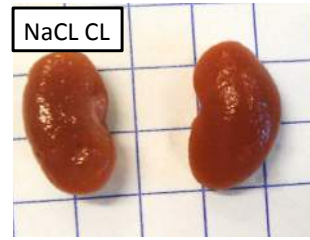
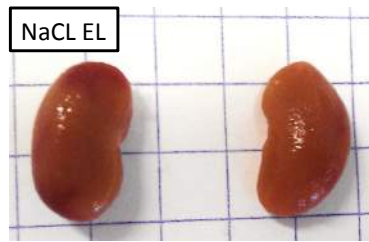


	RATIO
Number of XY Pairs	54
Spearman r	0.6789
95% confidence interval	0.4963 to 0.8040
P value (two-tailed)	< 0.0001
P value summary	****
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation
Is the correlation significant? (alpha=0.05)	Yes

Annexe 3. Le ratio R1/R2 est corrélé à l'urée plasmatique. Les macrophages rénaux sont identifiés en cytométrie en flux comme F4/80^{low}CD11b^{high} (R1), ou F4/80^{high}CD11b⁺ (R2). La répartition des macrophages en R1 ou R2 est exprimée par le ratio entre le nombre de R1 et le nombre de R2 est reportée sur l'axe des ordonnées. La fonction rénale donnée par la valeur de l'urée plasmatique (BUN pour blood urea nitrogen) est reportée sur l'axe des abscisses. L'analyse statistique détaillée dans l'encart indique une corrélation statistiquement significative entre les deux paramètres étudiés.



Annexe 4. Paramètres généraux et métaboliques des souris sept mois après rhabdomyolyse. 3 groupes sont étudiés. NaCl: sérum salé, Gly: glycérol, Glycérol + CL: glycérol + clodronate liposomal. N=6 / groupe. **(A)** poids des souris. **(B)** Masse grasse évaluée en echo-MRI. **(C)** Insulinémie dosée 15 minutes après une injection intra-péritonéale de glucose. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$. La rhabdomyolyse semble modifier la composition corporelle à long terme. Les souris Glycérol ont une moindre élévation de l'insulinémie en réponse au glucose, et semblent donc avoir une meilleure sensibilité à l'insuline et rapport avec leur masse grasse plus faible. Le CL semble dénué d'effet sur ces paramètres.



Annexe 5. Aspect macroscopique des reins 7 mois après rhabdomyolyse. 6 groupes sont étudiés. NaCL: sérum salé, EL: empty liposomes, CL: clodronate liposomal, Gly: glycérol, pre: injection J-2 et J-1, post injection J+6 J+7, Rehy: réhydratation par sérum salé (5 injections H6, H24, H32, H48, H56). Exemples représentatifs. 1 carré = 50 mm.

7. Imagerie d'une molécule d'adhésion endothéliale impliquée dans le recrutement des macrophages rénaux (note technique)

Avant-propos

Nous venons de décrire le rôle de l'infiltrat macrophagique dans les lésions rénales induites par la rhabdomyolyse dans un modèle murin. En parallèle de ce travail, et en collaboration avec l'INSERM U919, nous avons mené une étude portant sur l'intérêt de l'imagerie moléculaire de VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*) dans des situations d'inflammation rénale.

VCAM-1 est un acteur prépondérant du recrutement des monocytes inflammatoires dans le tissu rénal et nous avons observé au préalable que son expression était augmentée dans le modèle de rhabdomyolyse. Sa détection en IRM, via des anticorps couplés à des micro-particules d'oxyde de fer, permet de diagnostiquer une sur-expression précoce et de réaliser un suivi longitudinal.

Cette technique avait été mise au point et utilisée dans le champ de la neurologie. Nous avons voulu savoir si elle pouvait être appliquée dans le champ de la néphrologie.

7.1 Pourquoi appliquer l'imagerie moléculaire de VCAM-1 au rein ?

7.1.1 Nécessité de nouvelles méthodes diagnostiques

Dans le domaine des maladies rénales, la détection de l'inflammation silencieuse est un enjeu majeur. Disposer d'outils sensibles et spécifiques permettrait de diagnostiquer les atteintes de manière plus précoce, les stratifier selon leur sévérité, et évaluer la réponse à des thérapeutiques.

La biopsie rénale fait référence pour le diagnostic. Mais ses inconvénients (risque hémorragique, non-informativité, biais d'échantillonnage) empêchent de la considérer pour un suivi rapproché.

Les méthodes non-invasives offrent l'avantage d'être répétées de manière itérative. Parmi elles, l'étude des biomarqueurs urinaires est prometteuse. Certaines limitations restreignent encore leur utilisation au domaine expérimental. En parallèle, les techniques d'imagerie ont pris une place grandissante. De nouvelles stratégies ont été déployées pour pallier la toxicité de certains agents de contraste (produit de contraste iodé, gadolinium). Récemment, une méthode d'imagerie moléculaire d'une molécule d'adhésion endothéliale, VCAM-1, a été mise au point.

7.1.2 Principe de l'imagerie moléculaire de VCAM-1

7.1.2.1 VCAM-1, une cible pertinente

VCAM-1, aussi connue sous le nom CD106 ou INCAM-10, est une protéine membranaire appartenant à la superfamille des immunoglobulines. VCAM-1 joue un rôle fondamental dans la diapédèse (mentionnée dans l'introduction, voir figure 13), en permettant l'extravasation des leucocytes (lymphocytes et monocytes) exprimant ses ligands (intégrine $\alpha 4\beta 1$ ou VLA-4 (Very Late Antigen-4) et l'intégrine $\alpha 4\beta 7$ [223]). En condition homéostatique, VCAM-1 est faiblement exprimée par l'endothélium [224]. En réponse à plusieurs cytokines (LPS, IL-1 β , IL-13, TNF- α , IL-4) [224, 225] VCAM-1 est induite. Son expression est également dépendante de la composition de la matrice sur laquelle reposent les cellules endothéliales [226]. VCAM-1 existe sous plusieurs formes : membranaire et soluble (sVCAM-1). Sa forme membranaire présente des critères pertinents pour être utilisée en tant que biomarqueur de l'inflammation : elle est exprimée par l'endothélium, donc dans un compartiment accessible à la perfusion ; elle est surexprimée en condition pathologique.

7.1.2.2 La détection de VCAM-1 est possible dans le cerveau via les MPIOs

La visualisation de VCAM-1 est désormais possible via l'utilisation de MPIOs pour *microparticles of iron oxide*, couplées à un anticorps spécifique anti-VCAM-1 (α VCAM-1). Les MPIOs font une taille allant de 0,76 à 1,63 μ m. Elles ont la propriété de pouvoir perturber l'homogénéité locale d'un champ magnétique sur une distance de 50 fois leur diamètre, donc de créer un contraste détectable en IRM. Elles sont trop grosses pour pouvoir s'extravaser ou être captées par les cellules endothéliales.

La première publication validant la faisabilité de cette technique est parue en 2007. Dans un modèle murin d'inflammation cérébrale reposant sur l'injection d'IL-1 β , les auteurs ont démontré que la détection de VCAM-1 était possible *in vivo* à un temps précoce où la pathologie n'était pas détectable par ailleurs sur des séquences classiques d'IRM. Les effets de contraste délimitant les vaisseaux étaient puissants et quantifiables, et l'élimination rapide des MPIOs du compartiment sanguin donnait un bruit de fond négligeable. La spécificité des MPIOS était démontrée par l'absence de contraste suite à l'injection d'un anticorps anti-VCAM-1 trente minutes avant l'injection des MPIO- α VCAM-1[227].

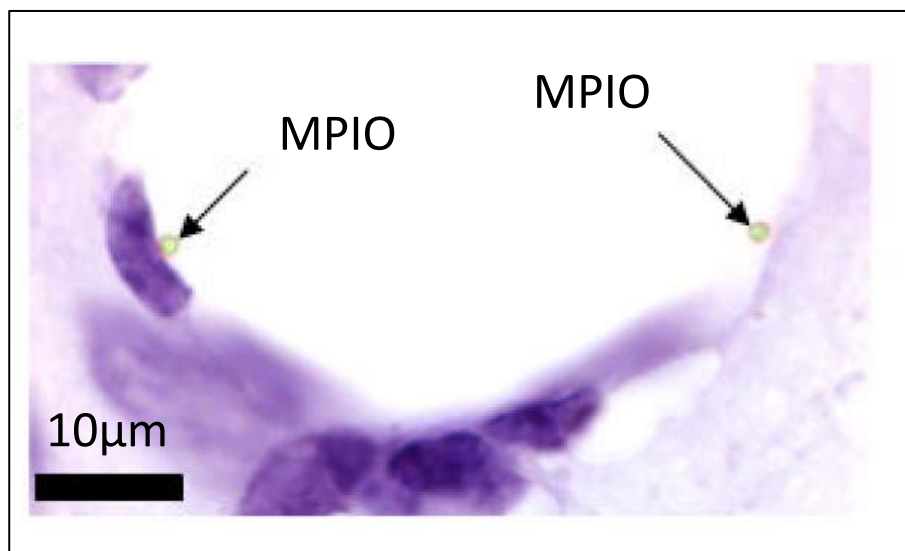


Figure 40 : Visualisation de MPIO- α VCAM-1 au contact d'une veinule en microscopie optique.

Coupe de cerveau murin, coloration cresyl violet.

Par la suite, la technique a été utilisée dans plusieurs travaux en neurologie [228]. Un exemple d'images obtenues est montré ci-après. Il s'agit d'un modèle murin d'accident cérébral ischémique reposant sur l'occlusion de l'artère carotide commune, où l'on démasque l'inflammation après 48 heures [229].

Les zones d'expression de VCAM-1 correspondent aux zones en hyposignal (noir).

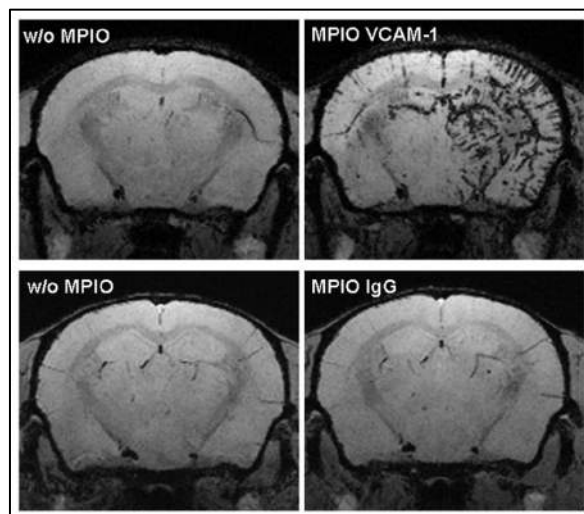


Figure 41 : Images de cerveau, en IRM après injection de MPIO- α VCAM-1.

Colonne de gauche, image de référence avant l'injection. Colonne de droite, image après injection. Ligne du haut : injection de MPIO α VCAM-1, ligne du bas : MPIOs couplées à anticorps non spécifique.

L'inflammation étant un processus ubiquitaire, le tissu rénal semblait pouvoir bénéficier du même type d'explorations. Voici un aperçu des données disponibles sur l'expression de VCAM-1 dans le contexte des maladies rénales.

7.1.3 Données disponibles sur VCAM-1 dans le rein

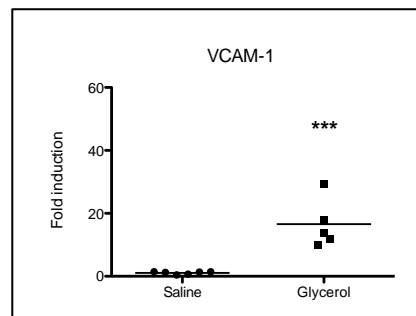
7.1.3.1 sVCAM-1 dans le sang

Chez les patients atteints de néphropathie à IgA, les taux sanguins de sVCAM-1 sont anormalement élevés [230]. Chez les patients atteints de néphropathie lupique, alors que les taux sanguins de sVCAM-1 sont normaux, il existe une association significative entre sVCAM-1 fluctuant au sein des valeurs de référence et l'activité de la maladie [231]. Chez les patients diabétiques de type 1 avec macro-albuminurie, sVCAM-1 est retrouvé en excès [232]. Chez les patients hypertendus atteints de diabète de type 2, on trouve une corrélation positive entre sVCAM-1 et l'excrétion urinaire d'albumine [233].

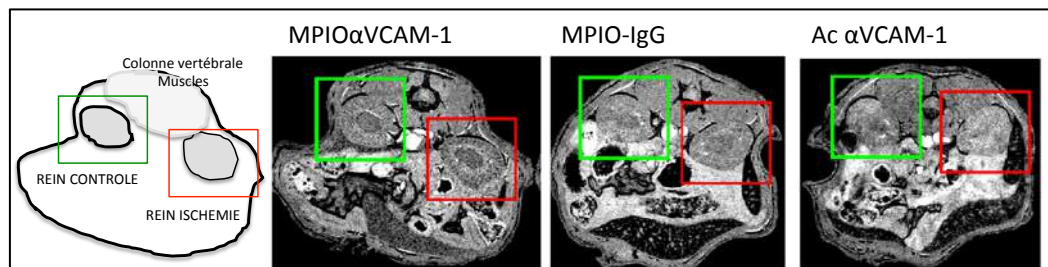
7.1.3.2 VCAM-1 dans les urines

Dans une étude menée chez 74 patients lupiques, le taux urinaire de VCAM-1 est significativement associé à l'index d'activité de la néphropathie et la classe IV. Une corrélation négative est signalée entre le taux urinaire de VCAM-1 et l'index de chronicité de la maladie. Dans d'autres cadres nosologiques, une élévation de VCAM-1 est également notée : GN associées aux ANCA, hyalinose segmentaire et focale, ainsi que GN extra-membraneuse[234].

Dans notre modèle de rhabdomyolyse, nous avons pu observer une augmentation significative de la transcription de VCAM-1 à J2 (extraction ARN de rein total, données non publiées N=5 ****p<0,001) :



En matière d'imagerie, à ce jour, un seul travail décrit la détection de VCAM-1 en IRM au cours d'une maladie rénale. Il s'agit d'une étude publiée en 2010 dans un modèle murin d'ischémie-reperfusion rénale [240].



De gauche à droite : schéma de repérage, puis image après MPIO α VCAM-1, MPIO couplés à un anticorps non spécifique (contrôle négatif), et MPIO α VCAM-1 après un traitement par anticorps anti VCAM-1 (saturant les sites, contrôle négatif). L'ischémie rénale s'accompagne d'une prise de contraste du rein (hyposignal noir) uniquement après MPIO α VCAM-1.

7.1.4 Introduction au travail personnel

VCAM-1 semble détectable dans le rein avec la technique des MPIOs. VCAM-1 semble surexprimé dans le rein lors de la rhabdomyolyse. Nous avons voulu savoir si VCAM-1 était visualisable grâce aux MPIOs dans notre modèle, et étendre l'utilisation de la technique à d'autres situations d'agression rénale aiguës et chroniques.

Dans quatre modèles murins de néphropathies :

- aiguës : choc septique induit par le LPS et tubulopathie succédant à une rhabdomyolyse
- chroniques : diabète par injection de streptozotocine et réduction néphronique de 5/6ème

les souris ont bénéficié d'une IRM après injection de MPIO- α VCAM-1, de manière répétée.

Dans les situations d'insuffisance rénale aiguë, les images obtenues ont témoigné d'un enrichissement massif en MPIO- α VCAM-1 reflétant une inflammation majeure, qui diminue dans le temps parallèlement à la récupération rénale. Dans le modèle de néphropathie diabétique, une surexpression de VCAM-1 a été observée, alors que la fonction rénale était normale, suggérant une détection infra-clinique de l'inflammation. Dans le modèle de réduction néphronique, le niveau de VCAM-1 était inchangé. Les acquisitions ont permis des analyses individuelles, longitudinales et systémiques (cœur, cerveau, rein) des souris. L'expression de VCAM-1 a pu être confirmée en immunofluorescence.

7.2 Manuscrit

Ce travail a été soumis au journal Radiology.

Ultra-sensitive molecular MRI of endothelial cell activation in acute and chronic kidney injuries

Julie Belliere^{1,2}, Sara Martinez de Lizarrondo³, Audrey Le Béhot³, Christine Delage^{2,4}, Dominique Chauveau^{1,2,5}, Joost P. Schanstra^{1,2}, Jean-Loup Bascands^{1,2}, Denis Vivien³, Maxime Gauberti³.

¹ Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), U1048, Institute of Cardiovascular and Metabolic Diseases, Toulouse, France.

² Université Paul Sabatier, Toulouse, France.

³ Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), UMR-S U919, Serine Proteases and Pathophysiology of the Neurovascular Unit, Caen, France.

⁴ Department of Microsurgery, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM UMS006), Toulouse, France.

⁵ Department of Nephrology, Dialysis and Organ Transplantation, Faculté Purpan, CHU Rangueil, Toulouse, France

Corresponding author: Maxime Gauberti, PhD.
Serine Proteases and Pathophysiology of the Neurovascular Unit
INSERM U919, GIP Cyceron / Université de Caen
Bd Henri Becquerel, 14074 Caen, France
Phone: 0033 2 31 47 01 66
Email: maxime.gauberti@gmail.com

The logo for the journal Radiology, featuring the word "Radiology" in a blue serif font inside a light gray rectangular box.

**Ultra-sensitive molecular MRI of endothelial cell activation
in acute and chronic kidney injuries**

Journal:	<i>Radiology</i>
Manuscript ID:	RAD-14-0917
Manuscript Type:	Original Research
Manuscript Categorization Terms:	Animal Studies < 1. SUBJECT MATTER, Molecular Imaging < 2. MODALITIES/TECHNIQUES, Molecular Imaging-Probe Development < 2. MODALITIES/TECHNIQUES, Molecular Imaging-Nanoparticles < 2. MODALITIES/TECHNIQUES, Urinary < 4. AREAS/SYSTEMS, Kidney < 5. STRUCTURES, Brain/Brain Stem < 5. STRUCTURES, Heart < 5. STRUCTURES, Inflammation < 6. TOPICS, MR-Contrast Agent < 2. MODALITIES/TECHNIQUES, MR-Imaging < 2. MODALITIES/TECHNIQUES, Experimental Investigations < 7. METHODOLOGY

SCHOLARONE™
Manuscripts

Ultra-sensitive molecular MRI of endothelial cell activation in acute and chronic kidney injuries

Manuscript type: Original Research

Advances in knowledge:

1. We present a preclinical method to achieve ultra-sensitive and fast measurement of renal inflammation using magnetic resonance imaging (MRI).
2. The injection of microparticles of iron oxide (MPIO) targeted to vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), which allows *in vivo* visualization of endothelial cell activation in the brain, can be used to simultaneously monitor kidneys and heart.
3. Molecular imaging allows pre-symptomatic diagnosis of chronic kidney injury (diabetic nephropathy).
4. Molecular imaging allows longitudinal assessment of kidney recovery following acute kidney injury (rhabdomyolysis).
5. Molecular imaging allows kidney injury monitoring in individuals with chronic disease (subtotal nephrectomy).

Summary statement: MPIO- α VCAM-1 enhanced MRI allows specific and sensitive imaging of endothelial cells activation in the kidneys and is therefore an efficient approach for non-invasive monitoring of kidney inflammation.

Implications for Patient Care: N/A

ABSTRACT

Purpose: Despite recent developments in the field of biomarkers, kidney biopsy remains the only available tool for unbiased evaluation of nephropathy. Since renal endothelium is affected in most acute and chronic kidney diseases, non-invasive monitoring of endothelial cell activation represents a potential alternative for the evaluation of renal injury. In the present study, our aim was to evaluate the use of magnetic resonance imaging (MRI) enhanced by an optimized formulation of microparticles of iron oxide (MPIO) targeted to vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) for *in vivo* measurement of endothelial cell activation in the kidneys.

Materials and Methods: Several models of acute and chronic kidney injuries were performed in mice and MPIO- α VCAM-1 were detected after intravenous injection by T2*-weighted 7 Tesla MRI.

Results: In a model of sepsis, we provide evidence that MPIO- α VCAM-1 enhanced MRI allows semi-quantitative measurement of ongoing renal inflammation, whereas standard MRI failed to reveal any alteration. Similar results were obtained following rhabdomyolysis-induced acute kidney injury, and confirmed by classical immunohistochemistry. Longitudinal follow-up of individual mice was also performed *via* repeated MPIO- α VCAM-1 enhanced MRI, showing a decrease in VCAM-1 signal, paralleling kidney function recovery. Lastly, we detected endothelial cell activation in the kidneys of diabetic mice (streptozotocin) at a preclinical stage. Interestingly, in all these experimental models, we were able to perform concomitant renal, cerebral and cardiac molecular MRI which allowed us to discriminate between systemic inflammation and kidney-specific endothelial activation.

Conclusion: We demonstrate that MPIO- α VCAM-1 enhanced MRI is an efficient approach for non-invasive monitoring of kidney inflammation.

INTRODUCTION

The local inflammatory response is a common pathway to most kidney aggressions, ensuing acute kidney injury (AKI) or associated with many chronic kidney diseases (CKD). In particular, chronic inflammation plays a key role in the development and progression of CKD (1). While detection of silent inflammation would be of critical importance to allow early diagnosis, stratify severity and manage kidney injury, it should be acknowledged that currently available non-invasive biological biomarkers do not meet the required performance for detecting or monitor kidney inflammation(2). Specimens obtained by biopsy afford many advantages but cannot easily be repeated. Imaging methods, including positron emission tomography (PET) or magnetic resonance imaging (MRI) have been developed as alternative strategies to non-invasively monitor kidney injury (3-6). Although PET is highly sensitive, its low availability, low spatial resolution and long acquisition time preclude its wide clinical use. In contrast, MRI is widely available, allows fast high resolution imaging (7) and functional imaging (8, 9). However, currently available contrast agents for molecular MRI lack sensitivity, specificity, and require a long interval between injection and imaging (10).

Recently, a new formulation of microparticles of iron oxide targeted against VCAM-1 (MPIO- α VCAM-1) (11, 12) were used to achieve ultra-sensitive molecular imaging of central nervous system disorders. By taking advantage of the accessibility of the cerebrovasculature to large contrast-carrying particles (13), this MRI method reached unprecedented sensitivity and specificity to reveal endothelial cell activation in the brain. In the present study, our aim was to evaluate the use of MPIO- α VCAM-1 enhanced MRI to assess kidney inflammation in several mouse models of AKI and CKD.

MATERIAL AND METHODS

Animals

Rhabdomyolysis and diabetes studies were performed on 8-week-old C57Bl6J male mice (Janvier, Le Genest-Saint-Isle, France). Lipopolysaccharide (LPS) and Subtotal nephrectomy (SNX) studies were performed on 8-week-old male Swiss mice (Janvier, France). Animals were maintained under specific pathogen-free conditions at the Centre Universitaire de Ressources Biologiques (CURB, Basse-Normandie, France) and all had free access to food and tap water before and after the procedures. Experiments were performed in accordance with the French (Decree 87/848) and the European Communities Council (Directive 86/609) guidelines.

LPS-induced systemic sepsis model

Swiss mice received an intra-peritoneal (i.p.) injection of LPS from *E. coli* (0111:B4, Sigma-Aldrich, Lisle d'Abeau, France). MRI was performed 48 hours after LPS administration.

Rhabdomyolysis-induced acute kidney injury (AKI)

To induce rhabdomyolysis, the animals were injected with 7,5mL/kg 50% Glycerol (99,5% m/v, VWR International S.A.S., France) intramuscularly in each thigh caudal muscle or with saline as a control (14).

Subtotal (5/6) nephrectomy

Mice were submitted to subtotal nephrectomy as previously described(15) with minor modifications. The procedure was performed in anesthetized mice (ketamine, xylazine, buprenorphine i.p.). The left kidney was exposed *via* a flank incision and both poles were excised (approximately two thirds of the kidney), leaving a small amount of renal tissue around the left ureter and hilar vessels. Blood loss was minimized by the application of gelatin sponges. Finally, the right kidney was removed, leaving 20-25% of the total renal mass.

Streptozotocin-induced diabetes model

Mice received i.p. injections of streptozotocin (STZ 50 mg/kg, sigma) during 5 days after 4 hours of fasting. Mice have been tested for sufficient levels of hyperglycemia (>300 mg/dl) two days after injection and 4 weeks post-injection.

Targeting-moiety conjugation to MPIO

Microparticles of iron oxide (MPIO; diameter 1.08 μm) with p-toluenesulphonyl reactive surface groups (Invitrogen) were covalently conjugated to purified monoclonal rat anti-mouse monoclonal antibodies for VCAM-1 as previously described(11). Mice received intravenous injection of 1.0 mg/kg (equivalent Fe) of conjugated MPIOs for contrast-enhanced MRI. Imaging was performed 10 minutes after particles administration.

Magnetic Resonance Imaging (MRI)

MRI Experiments were carried out on a Pharmascan 7 T/12 cm system using surface coils (Bruker, Germany). T2-weighted images were acquired using a MSME sequence: TE/TR 51ms/2500ms with 70 μm *70 μm *500 μm spatial resolution. High resolution imaging: 3D respiration-gated T2*-weighted gradient echo imaging with flow compensation (GEFC, spatial resolution of 93 μm *70 μm *70 μm interpolated to an isotropic resolution of 70 μm) with TE/TR 12.6ms/200ms and a flip angle (FA) of 24° was performed to visualize MPIOs (acquisition time= 8 min). Cardiac imaging was performed using respiratory and electrocardiographic gating. All high-resolution T2*-weighted images presented in this study are minimum intensity projections of 4 consecutive slices (yielding a Z resolution of 280 μm). Low resolution imaging was performed using a T2* weighted Fast low angle shot sequence with TR/TE 100ms/6ms and matrix size 128x128. Signal voids quantification on 3D T2*-weighted images were quantified using automatic Otsu tresholding in ImageJ software (v1.45r). Results are presented as the volume of MPIOs-induced signal void divided by the

1
2
3 volume of the structure of interest (in percent). When appropriate, mice randomly received
4
5 MPIO-IgG or MPIO- α VCAM-1.
6

7 8 **Immunohistochemistry**

9
10 Immunohistochemistry was performed as previously described(11, 12). Image analysis was
11
12 performed using ImageJ software. A vessel was considered VCAM-1⁺ when the fluorescence
13
14 signal was distinguishable from the background (parenchymal auto-fluorescence).
15

16 17 **Statistical analysis**

18
19 Means, SD and Mann-Whitney U-test results were used to analyze the data. When comparing
20
21 two groups, a p-value < 0.05 was considered to be significant.
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

RESULTS

VCAM-1 imaging in systemic inflammation

We first induced a systemic inflammatory response by i.p. injection of LPS (1 mg/kg) (Supplementary Fig. 1). Kidney MRI with and without MPIO- α VCAM-1 was performed 48 hours thereafter. As shown in Fig. 1, pre-contrast conventional T2- and T2*-weighted imaging failed to reveal any parenchymal alteration in LPS-treated mice. Following MPIO- α VCAM-1 administration, signals on T2*-weighted imaging dramatically dropped (Fig. 1), revealing ongoing renal inflammation. We then performed MPIO- α VCAM-1 MRI after injection of increasing doses of LPS (from 0.1 to 0.8 mg/kg). Interestingly, the volume of MPIO- α VCAM-1-induced signal void paralleled the amount of LPS, revealing the feasibility of semi-quantitative measurement of inflammation (Fig. 2). High resolution imaging (compared to standard resolution) further increased sensitivity of MPIO- α VCAM-1 MRI (Fig. 2). Importantly, we observed that the contrast agent was rapidly cleared from the kidney, resulting in minimal background contrast 24 hours after MPIO- α VCAM-1 injection (Fig. 3), thus allowing repetitive assessment of kidney inflammation.

Since VCAM-1 overexpression in the kidney can either result from local endothelial activation or from systemic inflammation, multi-organ measurement of VCAM-1 expression is essential for consistent interpretation of kidney signals. Interestingly, a single injection of MPIO- α VCAM-1 allowed us to perform serial kidney, brain and heart imaging in the same animal. As expected, intraperitoneal LPS induced strong VCAM-1 overexpression in the heart and the brain, revealing that renal endothelial cell activation is of systemic origin in this model (Supplementary Fig. 2 and 3). The specificity of MPIO- α VCAM-1 MRI in the kidney

and heart was demonstrated by the lack of signal void after injection of control untargeted MPIO (MPIO-IgG) (Supplementary Fig. 4 and 5).

VCAM-1 imaging in AKI

Secondly, we examined whether VCAM-1 could be used as a marker of kidney injury in a rhabdomyolysis (RM)-induced AKI model (RM-AKI) (14). Two days after an intramuscular injection of glycerol, RM-AKI was obtained (Supplementary Fig. 6) and VCAM-1 was found to be overexpressed in the kidney. Accordingly, MPIO- α VCAM-1 enhanced T2*-weighted MRI showed a significant increase in signal void in glycerol-treated animals (Fig. 4), whereas classical T1 and T2-weighted imaging failed to reveal any alteration. This data was confirmed by histological staining in both cortical and medullar areas (Fig. 5A-B and Supplementary Fig. 7) and revealed that VCAM-1 expression was extraglomerular (Supplementary Fig. 8). Typical lesions of tubular necrosis were noticed on classical histology (not shown). As expected, RM-AKI was transient and kidney almost recovered a normal function 8 days after glycerol injection (Supplementary Fig. 6). Consistently, VCAM-1 MRI indicated a decrease in inflammation coherent with the repair phase (Fig. 6). Noteworthy, whereas kidney function was sub-normal, VCAM-1 expression was still clearly detectable at 8 days, suggesting persistent, sub-clinical inflammation. Since rhabdomyolysis induces primarily kidney injuries, expression of VCAM-1 in the brain was not induced by RM-AKI (Supplementary Fig. 7) and was, accordingly, not detected by MPIO- α VCAM-1 enhanced MRI (Supplementary Fig. 9). Similar results were obtained in the heart (data not shown).

VCAM-1 imaging allows detection of inflammation in subclinical chronic kidney injury

Then, we measured VCAM-1 in a model of streptozotocin (STZ)-induced diabetes mellitus. Four weeks after STZ treatment, renal function was preserved (data not shown). Except polyuria-related pyelocaliceal dilatation, unenhanced imaging failed to reveal any kidney alteration. In contrast, MPIO- α VCAM-1 MRI revealed significant renal inflammation as compared to controls (Fig. 7). VCAM-1 overexpression was confirmed with immunohistochemistry (Supplementary Fig. 10). To determine whether endothelial activation was of systemic origin in this model, we performed MPIO- α VCAM-1 enhanced brain and cardiac MRI in the same animals. Importantly, no VCAM-1 overexpression was detected in the brain after STZ treatment (Supplementary Fig. 11A), suggesting that renal VCAM-1 overexpression in diabetic mice was not due to a systemic inflammatory response to hyperglycemia but rather to an intrinsic kidney injury. Interestingly, MPIO- α VCAM-1 enhanced cardiac MRI revealed overexpression of VCAM-1 in the endocardium of STZ-treated mice (Supplementary Fig. 11B), suggesting that diabetes mellitus induces direct endomyocardial inflammation.

VCAM-1 imaging in chronic kidney injury

Lastly, to investigate whether CKD without ongoing kidney suffering was accompanied by endothelial cell activation, we injected MPIO- α VCAM-1 in subtotal nephrectomized mice (SNX). Although those mice exhibited elevated urea and creatinine levels, MPIO- α VCAM-1 did not reveal any kidney inflammation 8 weeks after surgery (Supplementary Fig. 12). Therefore, in stable CKD, MPIO- α VCAM-1 enhanced imaging does not reveal any kidney inflammation.

DISCUSSION

Altogether, our results demonstrate that MPIO- α VCAM-1 enhanced MRI could be very useful for rapid detection and subsequent monitoring of kidney injury in a wide range of clinical settings. Importantly, we provide evidence that MPIO- α VCAM-1 constitutes a biomarker of AKI that is independent of the renal function. Indeed, we demonstrated that VCAM-1 can be up-regulated in animals with normal renal function (as observed in the recovery phase of rhabdomyolysis and in diabetic mice) and, in contrast, can be normal in mice with impaired renal function (SNX mice). Therefore, the information provided by MPIO- α VCAM-1 enhanced imaging is complementary and independent of the blood creatinine level.

Advantages of molecular MRI compared to currently available approaches are numerous: MPIO- α VCAM-1 enhanced MRI is a fast, non-invasive method, which allows repeated VCAM-1 systemic monitoring at the protein level. Notably, the administered iron (1.0 mg/kg) and antibody (150 μ g/kg) doses, the delay between injection and imaging (<10 minutes) and the acquisition time (40 seconds for low resolution and 8 minutes for high-resolution) remain within acceptable values for clinical translation. These characteristics constitute significant improvements as compared to previously described approaches (3, 4, 6, 16-18).

Another promising finding of the current study arises from the STZ-treated mice, since MPIO- α VCAM-1 enhanced MRI can detect VCAM-1 overexpression before any biological manifestations of AKI. Thus, it appears promising for diagnosis of preclinical kidney diseases. This could be useful in a translational perspective to monitor clinical conditions, as exemplified by early allograft rejection or relapse in autoimmune diseases, since VCAM-1 is known to be overexpressed in both conditions (19, 20).

We also demonstrated that MPIO- α VCAM-1 enhanced MRI allows *in vivo* evaluation of endothelial VCAM-1 expression in the kidney, brain and heart after a single injection of the contrast agent. This possibility of multi-organ imaging is crucial for relevant interpretation of MPIO- α VCAM-1 induced signal void in the kidneys. Indeed, renal endothelial cell activation can either be triggered by parenchymal inflammation (as it occurs after rhabdomyolysis) or by a circulating pro-inflammatory molecule (as it occurs in sepsis) according to the clinical context. In the first case, VCAM-1 overexpression would be exclusively found in the kidneys, whereas, in the second, it would be present in the brain, heart and kidneys. Regarding cardiac imaging, our findings of endomyocardial inflammation in STZ-mice are supported by previous reports of morphological changes of the endocardial endothelium in experimental diabetes (21). Further studies are nevertheless needed to uncover the full range of applications for MPIO- α VCAM-1 enhanced MRI in cardiac imaging.

The major obstacle to the direct application of MPIO- α VCAM-1 in patients concerns their safety i.e. their poor biodegradability in their actual formulation. Liver essentially mediates MPIO elimination (6, 17): no retention in kidneys or lungs has been previously observed in animal models. Several works are in progress to improve their biocompatibility and commercial biodegradable microparticles are now available. The lack of iodine is another advantage of MPIO in the contexts of AKI and CKD(22). Another limitation from the use of iron-oxide based contrast agents arises in case of microhemorrhage-induced dark spots on T2*-weighted imaging, which can be misinterpreted as MPIO- α VCAM-1-induced signal void. The use of a short preparation period of normobaric hyperoxia may improve the specificity of the method in this context (23).

Practical Applications

In conclusion, we demonstrate the usefulness of MPIO- α VCAM-1 enhanced MRI to detect kidney injury in various experimental contexts. This method may be of diagnostic and

1
2
3 prognostic values in AKI and CKD with potential for clinical translation. Accordingly,
4
5 development of MPIO- α VCAM-1 for human use should be encouraged.
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

REFERENCES

1. Tonelli M, Sacks F, Pfeffer M, Jhangri GS, Curhan G Biomarkers of inflammation and progression of chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2005;68(1):237-245.

2. Arthur JM, Hill EG, Alge JL, Lewis EC, Neely BA, Janech MG et al. Evaluation of 32 urine biomarkers to predict the progression of acute kidney injury after cardiac surgery. *Kidney Int.* 2014;85(2):431-438.

3. Wen S, Liu D, Cui Y, Harris SS, Chen Y, Li KC et al. In vivo MRI detection of carotid atherosclerotic lesions and kidney inflammation in ApoE-deficient mice by using LOX-1 targeted iron nanoparticles. *Nanomedicine* 2013;():.

4. Thurman JM, Serkova NJ. Nanosized contrast agents to noninvasively detect kidney inflammation by magnetic resonance imaging. *Adv Chronic Kidney Dis* 2013;20(6):488-499.

5. Sargsyan SA, Serkova NJ, Renner B, Hasebroock KM, Larsen B, Stoldt C et al. Detection of glomerular complement C3 fragments by magnetic resonance imaging in murine lupus nephritis. *Kidney Int.* 2012;81(2):152-159.

6. Akhtar AM, Schneider JE, Chapman SJ, Jefferson A, Digby JE, Mankia K et al. In vivo quantification of VCAM-1 expression in renal ischemia reperfusion injury using non-invasive magnetic resonance molecular imaging. *PLoS One* 2010;5(9):e12800.

7. Sharfuddin A Renal relevant radiology: imaging in kidney transplantation. *Clin J Am Soc Nephrol* 2014;9(2):416-429.

8. Hueper K, Gutberlet M, Rong S, Hartung D, Mengel M, Lu X et al. Acute kidney injury: arterial spin labeling to monitor renal perfusion impairment in mice-comparison with histopathologic results and renal function. *Radiology* 2014;270(1):117-124.

9. Lanzman RS, Robson PM, Sun MR, Patel AD, Mentore K, Wagner AA et al. Arterial spin-labeling MR imaging of renal masses: correlation with histopathologic findings. *Radiology* 2012;265(3):799-808.

10. Kobayashi H, Choyke PL. Recipe for a new imaging biomarker: carefully combine target, reagent, and technology. *Kidney Int.* 2012;81(2):129-131.
11. Montagne A, Gauberti M, Macrez R, Jullienne A, Briens A, Raynaud J et al. Ultra-sensitive molecular MRI of cerebrovascular cell activation enables early detection of chronic central nervous system disorders. *Neuroimage* 2012;63(2):760-770.
12. Gauberti M, Montagne A, Marcos-Contreras OA, Le Béhot A, Maubert E, Vivien D. Ultra-sensitive molecular MRI of vascular cell adhesion molecule-1 reveals a dynamic inflammatory penumbra after strokes. *Stroke* 2013;44(7):1988-1996.
13. Gorelik M, Orukari I, Wang J, Galpoththawela S, Kim H, Levy M et al. Use of MR cell tracking to evaluate targeting of glial precursor cells to inflammatory tissue by exploiting the very late antigen-4 docking receptor. *Radiology* 2012;265(1):175-185.
14. Homsí E, Janino P, de Faria JBL. Role of caspases on cell death, inflammation, and cell cycle in glycerol-induced acute renal failure. *Kidney Int.* 2006;69(8):1385-1392.
15. Schanstra JP, Bachvarova M, Neau E, Bascands JL, Bachvarov D. Gene expression profiling in the remnant kidney model of wild type and kinin B1 and B2 receptor knockout mice. *Kidney Int.* 2007;72(4):442-454.
16. Southworth R, Kaneda M, Chen J, Zhang L, Zhang H, Yang X et al. Renal vascular inflammation induced by Western diet in ApoE-null mice quantified by (19)F NMR of VCAM-1 targeted nanobeacons. *Nanomedicine* 2009;5(3):359-367.
17. McAteer MA, Sibson NR, von Zur Muhlen C, Schneider JE, Lowe AS, Warrick N et al. In vivo magnetic resonance imaging of acute brain inflammation using microparticles of iron oxide. *Nat. Med.* 2007;13(10):1253-1258.
18. Wang P, Schuetz C, Ross A, Dai G, Markmann JF, Moore A. Immune rejection after pancreatic islet cell transplantation: in vivo dual contrast-enhanced MR imaging in a mouse model. *Radiology* 2013;266(3):822-830.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

19. Zhu L, Shi S, Liu L, Lv J, Zhang H. Increased plasma sVCAM-1 is associated with severity in IgA nephropathy. BMC Nephrol 2013;14():21.

20. Solez K, Racusen LC, Abdulkareem F, Kemeny E, von Willebrand E, Truong LD. Adhesion molecules and rejection of renal allografts. Kidney Int. 1997;51(5):1476-1480.

21. Popov D, Sima A, Stern D, Simionescu M. The pathomorphological alterations of endocardial endothelium in experimental diabetes and diabetes associated with hyperlipidemia. Acta Diabetol 1996;33(1):41-47.

22. Zhang Y, Wang J, Zhang J, Wang X, Jiang X. Effect of iodinated contrast media on renal function evaluated with dynamic three-dimensional MR renography. Radiology 2014;270(2):409-415.

23. Gaberel T, Gakuba C, Hebert M, Montagne A, Agin V, Rubio M et al. Intracerebral hematomas disappear on T2*-weighted images during normobaric oxygen therapy. Stroke 2013;44(12):3482-3489.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. MPIO- α VCAM-1 enhanced MRI reveals kidney inflammation induced by a systemic inflammatory challenge. Left: Top, Representative T2-weighted images of the kidney from LPS-treated mice (1 mg/kg) revealing no apparent abnormality. Middle, representative T2*-weighted images of the kidney from LPS-treated mice (1 mg/kg) before MPIO- α VCAM-1 administration. Bottom, same as middle but after MPIO- α VCAM-1 administration, revealing numerous confluent signal voids in both kidneys. Right: Top, Representative T2*-weighted images from control and LPS-treated mice (1 mg/kg) after MPIO- α VCAM-1 administration. Bottom, corresponding quantification (n=3 per group). *p<0.05 vs control/saline.

Figure 2. MPIO- α VCAM-1 enhanced MRI allows semi-quantitative measurement of kidney inflammation. Left: Representative standard-resolution (top) and high-resolution T2*-weighted images without (middle) and with magnification (low) from mice treated with either saline or different amounts of LPS (from 0.3 to 0.8 mg/kg). Right: Corresponding quantification (n=3). *p<0.05 vs control/saline.

Figure 3. MPIO- α VCAM-1 are rapidly cleared from the renal vasculature. Left: Kinetics of MPIO- α VCAM-1 clearance from the inflamed kidney (n=3 per group). Right: Corresponding quantification. Signal voids decreased gradually with time after MPIOs- α VCAM-1 injection.

Figure 4. MPIO- α VCAM-1 enhanced MRI reveals kidney inflammation induced by rhabdomyolysis. Representative T1-weighted, T2-weighted, T2*-weighted images of the kidneys from saline (left) or glycerol (right) treated mice before and after MPIO- α VCAM-1 administration.

Figure 5. MPIO- α VCAM-1 enhanced MRI reveals kidney inflammation induced by rhabdomyolysis. (A) Top: Representative high-magnification T2*-weighted images of saline- and glycerol-treated mice after MPIO- α VCAM-1 administration 48-hours after injections. Bottom: Corresponding quantification (n=5). (B) Representative immunohistological images of VCAM-1 expression (Green) in the kidney 48 hours after saline or glycerol treatment. Collagen type IV (Red) and DAPI (Blue) were used to assess renal tissue morphology. *p<0.05 vs control/saline.

Figure 6. Longitudinal MPIO- α VCAM-1 enhanced MRI reveals persistent VCAM-1 overexpression after rhabdomyolysis. Left: Representative T2*-weighted images after MPIO- α VCAM-1 administration 8 days after saline or glycerol injections. Right: Corresponding quantification (n=5 per group). *p<0.05 vs control/saline.

Figure 7. MPIO- α VCAM-1 enhanced MRI reveals kidney inflammation in diabetes mellitus. Left: Representative T2*-weighted images of kidneys from control and STZ-treated mice, after MPIO- α VCAM-1 administration. Right: Corresponding quantification (n=5 per group). *p<0.05 vs control/saline.

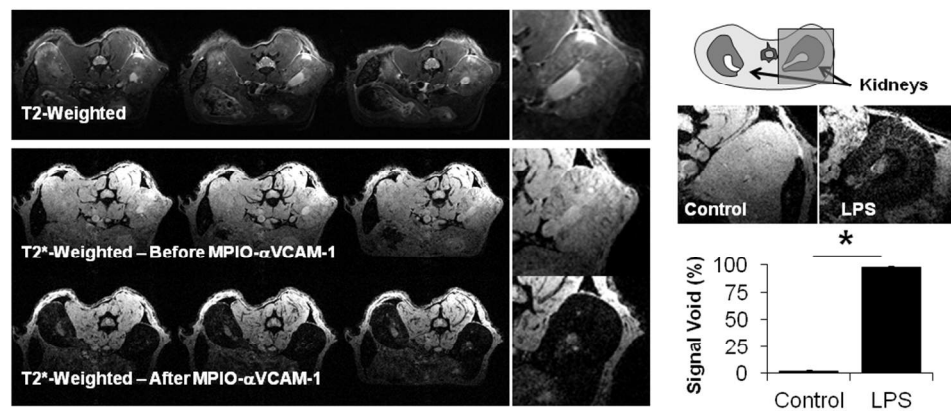


Figure 1. MPIO- α VCAM-1 enhanced MRI reveals kidney inflammation induced by a systemic inflammatory challenge. Left: Top, Representative T2-weighted images of the kidney from LPS-treated mice (1 mg/kg) revealing no apparent abnormality. Middle, representative T2*-weighted images of the kidney from LPS-treated mice (1 mg/kg) before MPIO- α VCAM-1 administration. Bottom, same as middle but after MPIO- α VCAM-1 administration, revealing numerous confluent signal voids in both kidneys. Right: Top, Representative T2*-weighted images from control and LPS-treated mice (1 mg/kg) after MPIO- α VCAM-1 administration. Bottom, corresponding quantification (n=3 per group). *p<0.05 vs control/saline. 288x124mm (96 x 96 DPI)

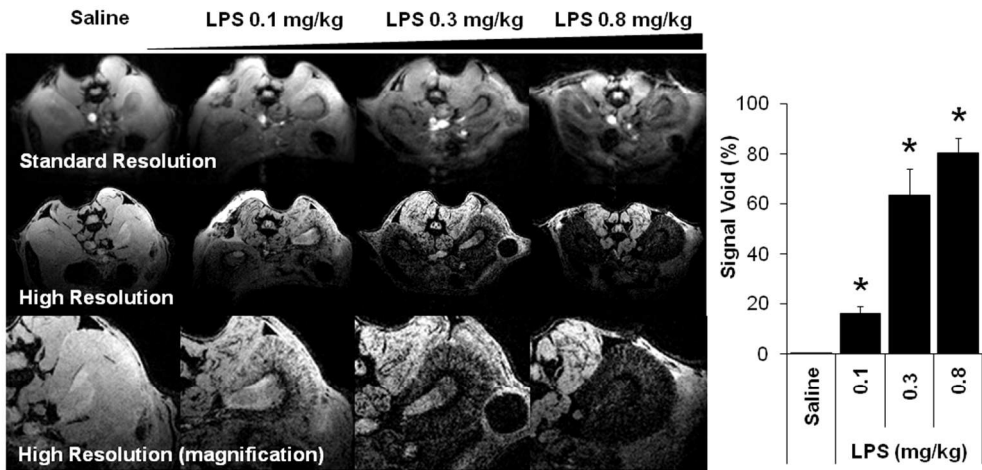


Figure 2. MPIO-αVCAM-1 enhanced MRI allows semi-quantitative measurement of kidney inflammation. Left: Representative standard-resolution (top) and high-resolution T2*-weighted images without (middle) and with magnification (low) from mice treated with either saline or different amounts of LPS (from 0.3 to 0.8 mg/kg). Right: Corresponding quantification (n=3). *p<0.05 vs control/saline. 278x135mm (96 x 96 DPI)

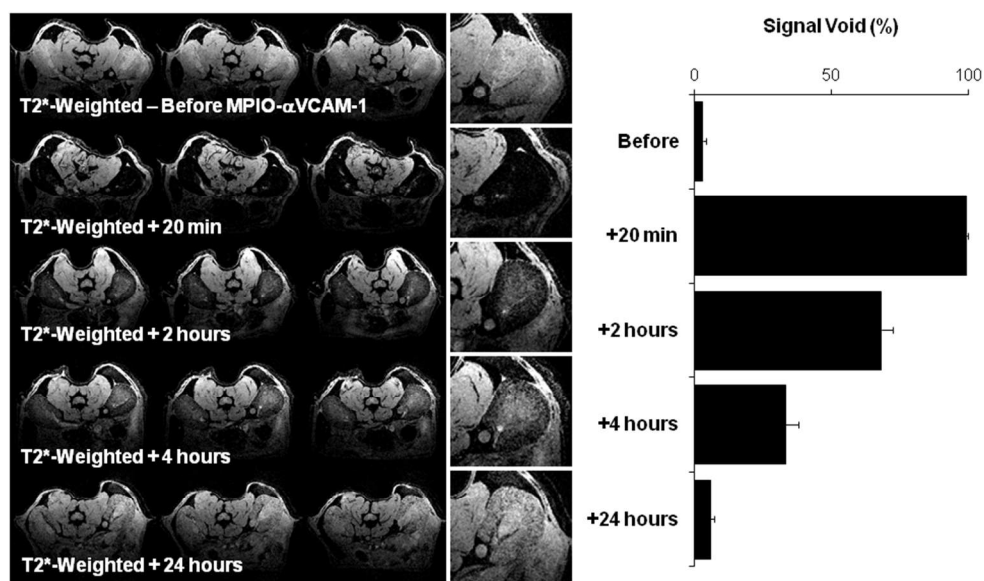


Figure 3. MPIO- α VCAM-1 are rapidly cleared from the renal vasculature. Left: Kinetics of MPIO- α VCAM-1 clearance from the inflamed kidney (n=3 per group). Right: Corresponding quantification. Signal voids decreased gradually with time after MPIOs- α VCAM-1 injection.
261x157mm (96 x 96 DPI)

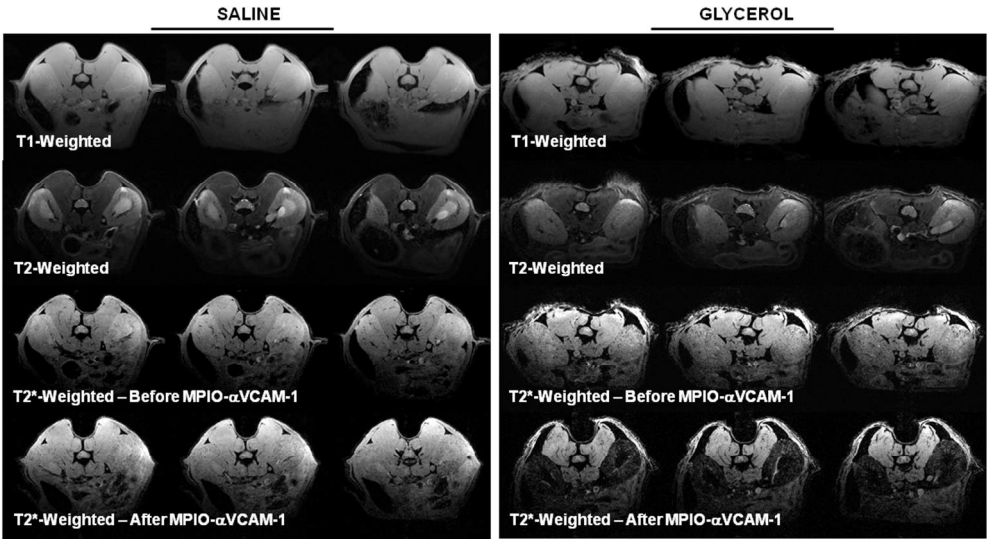


Figure 4. MPIO-αVCAM-1 enhanced MRI reveals kidney inflammation induced by rhabdomyolysis. Representative T1-weighted, T2-weighted, T2*-weighted images of the kidneys from saline (left) or glycerol (right) treated mice before and after MPIO-αVCAM-1 administration. 318x173mm (96 x 96 DPI)

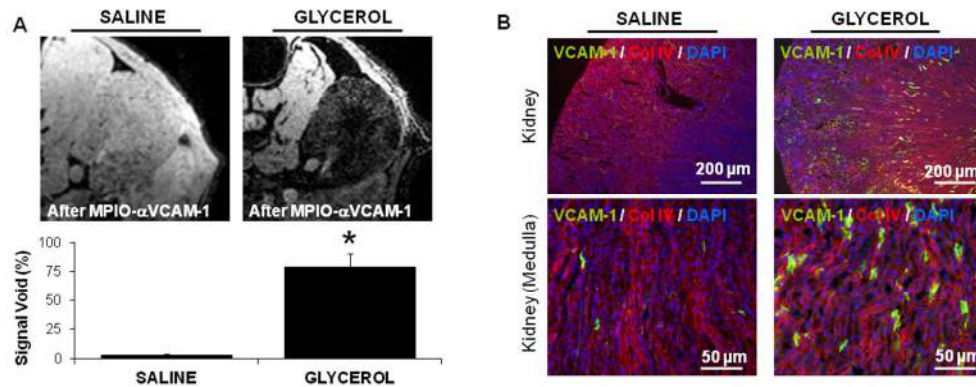


Figure 5. MPIO-αVCAM-1 enhanced MRI reveals kidney inflammation induced by rhabdomyolysis. (A) Top: Representative high-magnification T2*-weighted images of saline- and glycerol-treated mice after MPIO-αVCAM-1 administration 48-hours after injections. Bottom: Corresponding quantification (n=5). (B) Representative immunohistological images of VCAM-1 expression (Green) in the kidney 48 hours after saline or glycerol treatment. Collagen type IV (Red) and DAPI (Blue) were used to assess renal tissue morphology. *p<0.05 vs control/saline.
306x119mm (96 x 96 DPI)

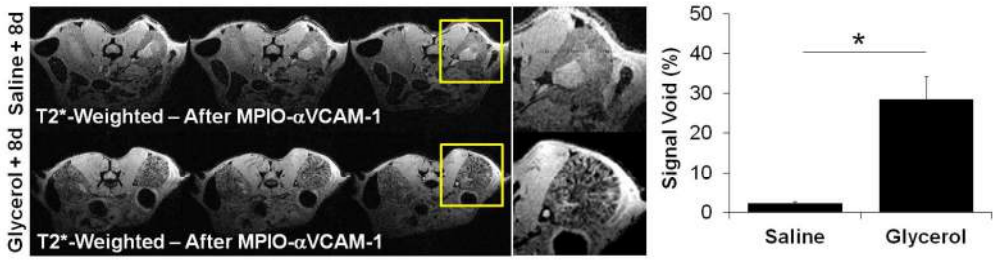


Figure 6. Longitudinal MPIO-αVCAM-1 enhanced MRI reveals persistant VCAM-1 overexpression after rhabdomyolysis. Left: Representative T2*-weighted images after MPIO-αVCAM-1 administration 8 days after saline or glycerol injections. Right: Corresponding quantification (n=5 per group). *p<0.05 vs control/saline.

423x117mm (96 x 96 DPI)

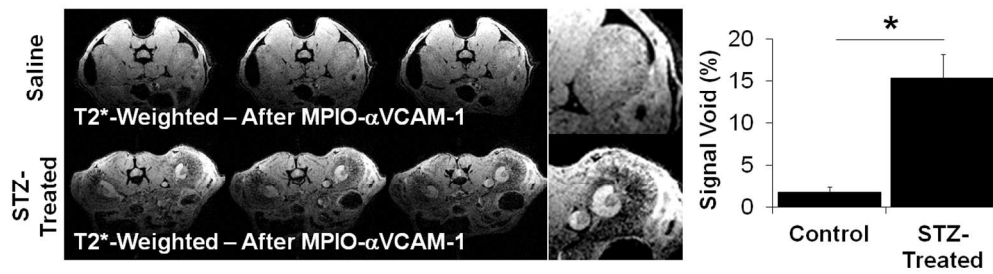
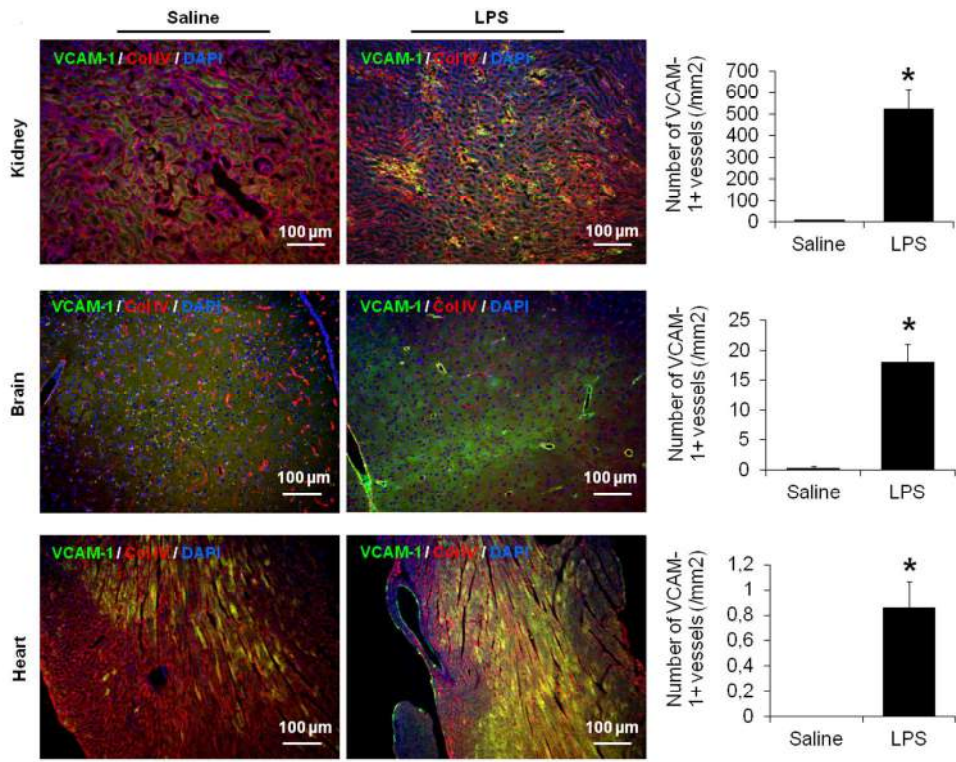
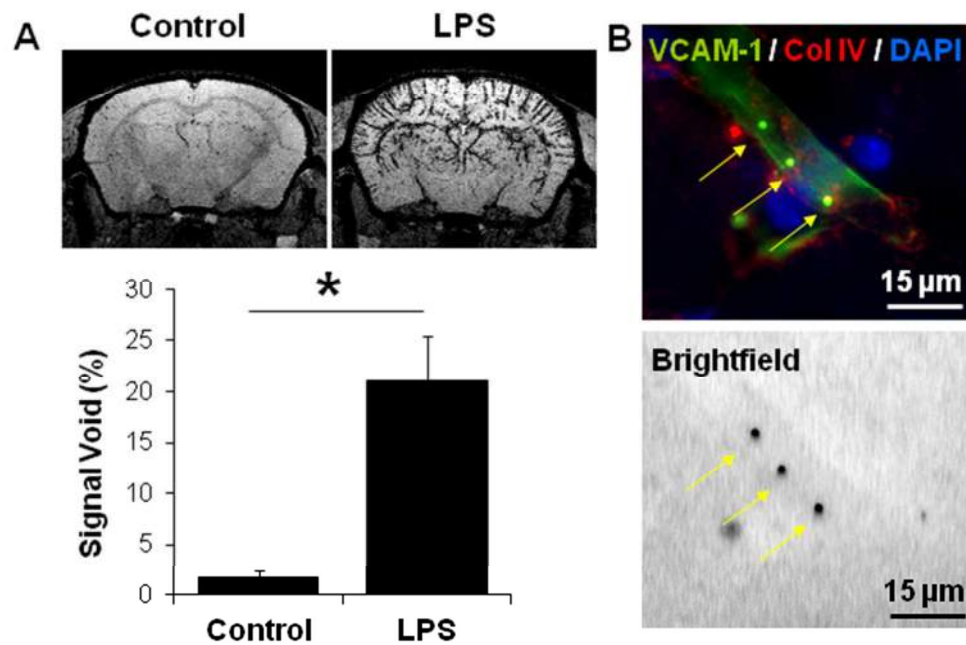


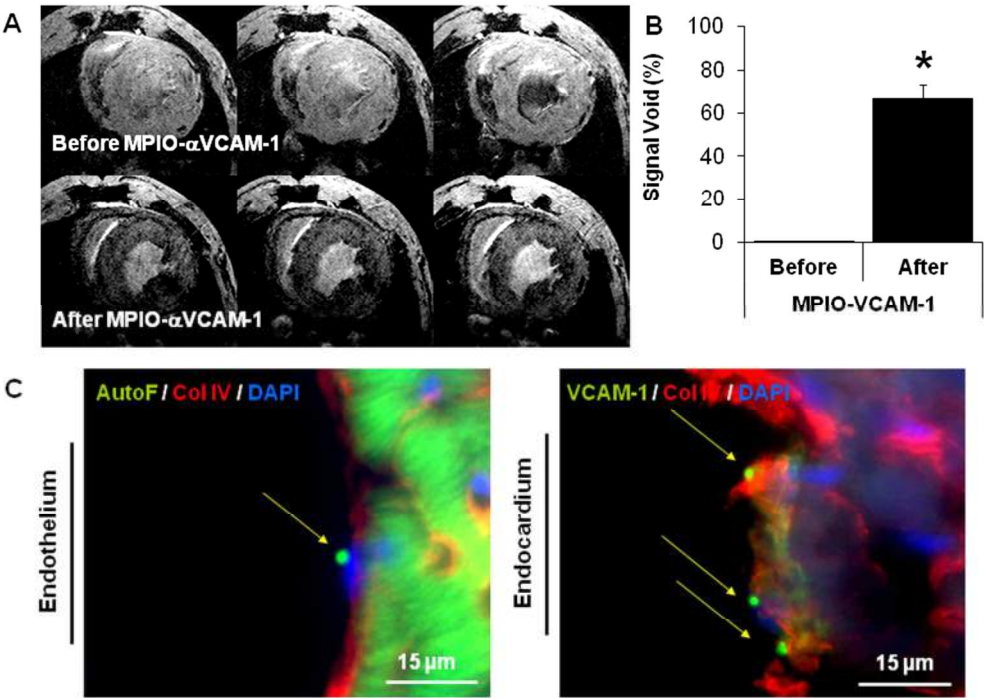
Figure 7. MPIO- α VCAM-1 enhanced MRI reveals kidney inflammation in diabetes mellitus. Left: Representative T2*-weighted images of kidneys from control and STZ-treated mice, after MPIO- α VCAM-1 administration. Right: Corresponding quantification (n=5 per group). *p<0.05 vs control/saline. 373x103mm (96 x 96 DPI)



Supplementary Figure 1. LPS induces overexpression of VCAM-1 in the kidney, brain and heart. Left: Representative immunohistological images of VCAM-1 in the kidneys, brain and heart of saline and LPS-treated mice (1 mg/kg, 24 hours after i.p. injection). Right: Corresponding quantification (n=3 per group). Since autofluorescence prevents reliable analysis of VCAM-1+ vessels in the cardiac microcirculation, only large vessels (>20 µm) were considered in the analysis.
313x248mm (96 x 96 DPI)

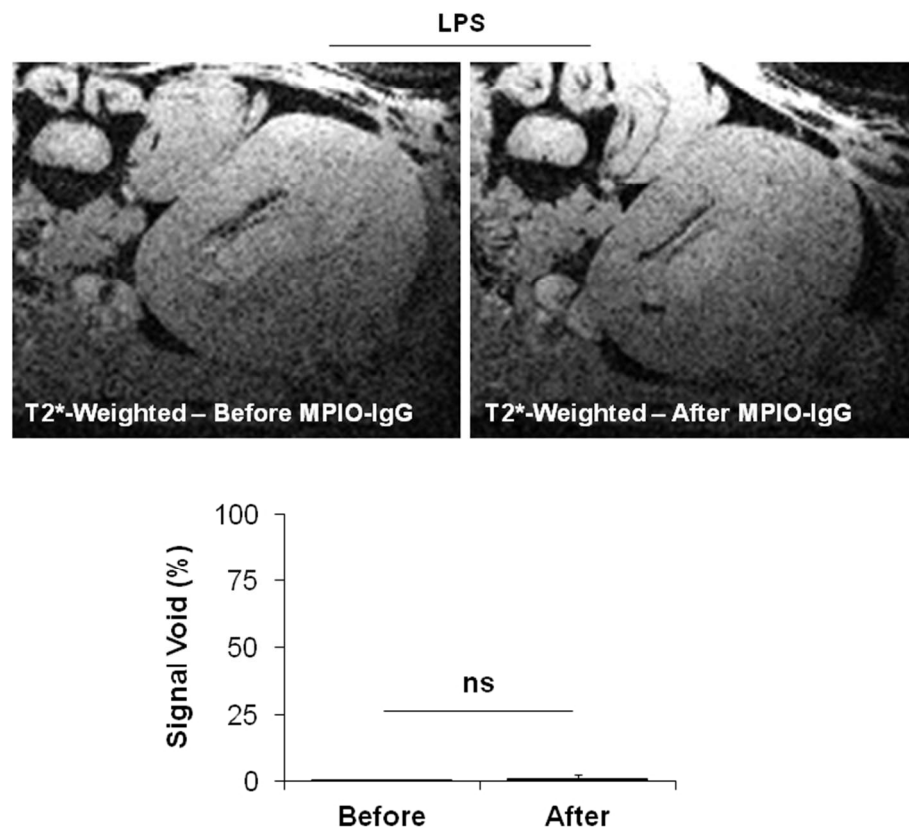


Supplementary Figure 2. A single MPIO- α VCAM-1 injection allows multiple organ imaging: example of the brain. (A) Top: Representative T2*-weighted images of the brain from control and LPS-treated mice (1 mg/kg) after MPIO- α VCAM-1 administration. Bottom: Corresponding quantification (n=3). (B) Representative images of MPIO- α VCAM-1 inside VCAM-1+ vessels in the brain using immunofluorescence (top) and brightfield microscopy (bottom). The yellow arrows indicate MPIO- α VCAM-1 localization. MPIOs are autofluorescent in green.

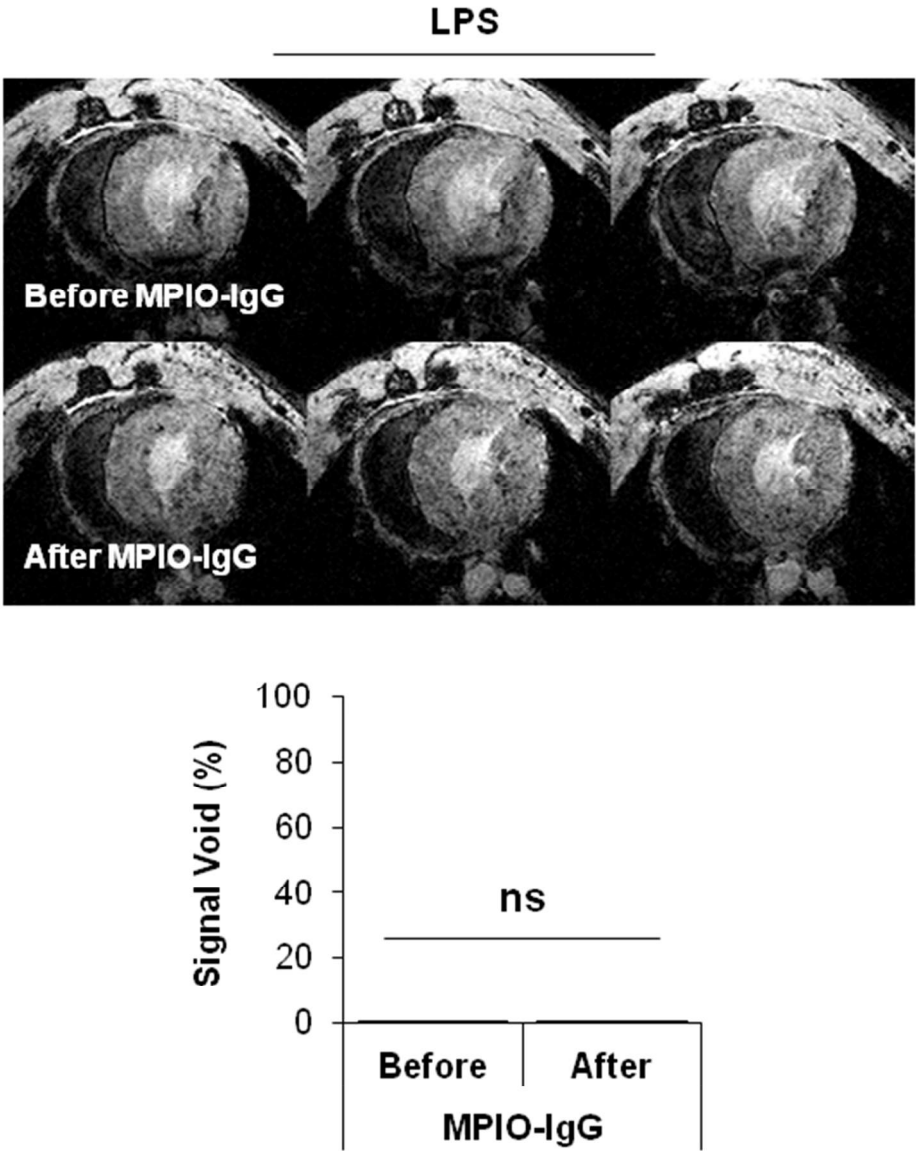


Supplementary Figure 3. A single MPIO- α VCAM-1 injection allows multiple organ imaging: example of the heart. (A) Representative T2*-weighted images of the heart from LPS-treated mice (1 mg/kg) before and after MPIO- α VCAM-1 administration. (B) Corresponding quantification (n=3 per group). (C) Immunohistological images of MPIO- α VCAM-1 in the heart endothelium (left) and endocardium (right). Green detects autofluorescence and/or VCAM-1, Red is collagen type IV and Blue is DAPI. The yellow arrows indicate MPIO- α VCAM-1 localization.

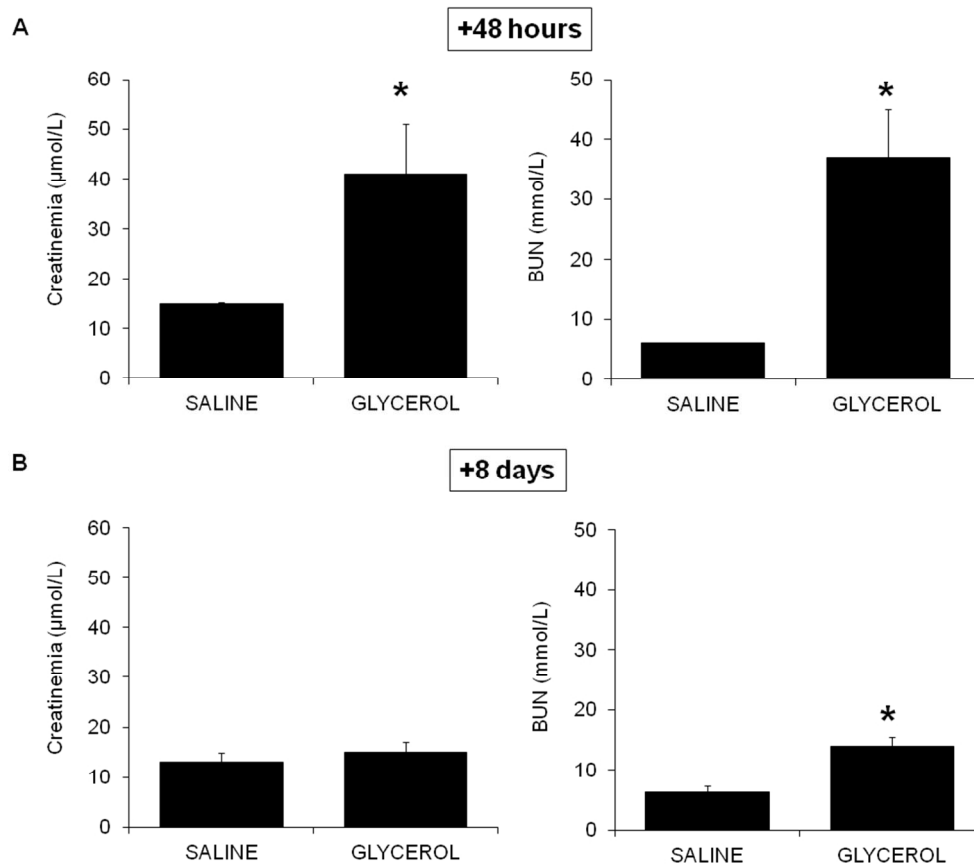
237x173mm (96 x 96 DPI)



Supplementary Figure 4. Non-targeted MPIO-IgG does not induce signal void in the kidneys of LPS-treated mice. Top: Representative T2* weighted images of the right kidney of LPS-treated mice before (left) and after (right) MPIO-IgG injection. Bottom: Corresponding quantification (n=4 per group).
223x192mm (96 x 96 DPI)

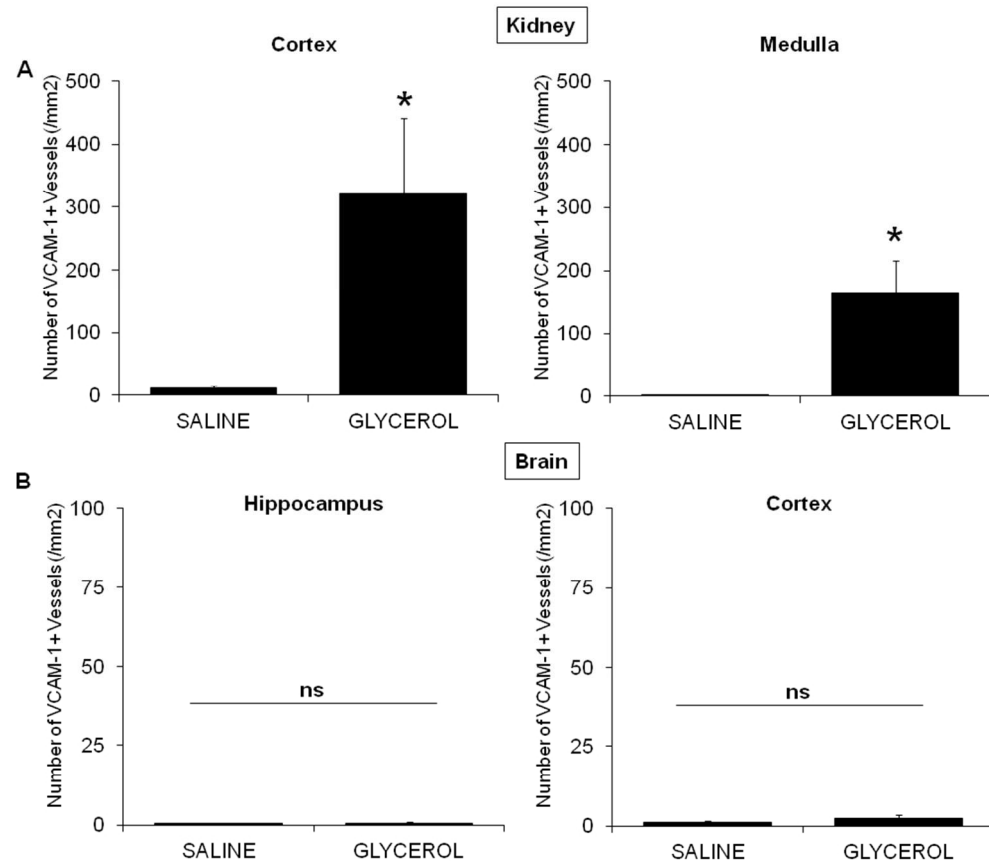


Supplementary Figure 5. Non-targeted MPIO-IgG does not induce signal void in the heart of LPS-treated mice. Top: Representative T2* weighted images of the heart of LPS-treated mice before (top) and after (bottom) MPIO-IgG injection. Bottom: Corresponding quantification (n=4 per group). 153x182mm (96 x 96 DPI)

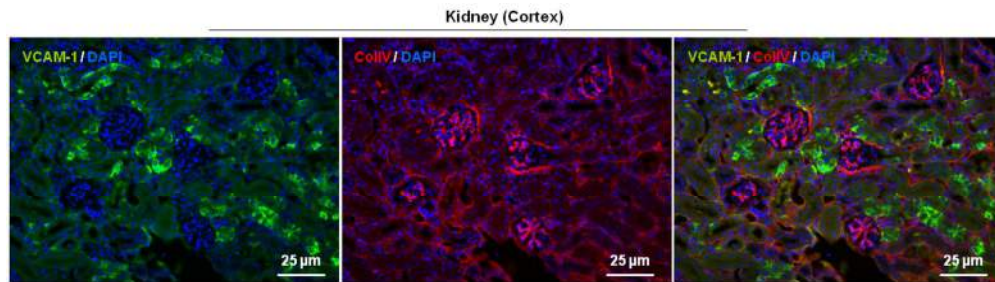


Supplementary Figure 6. Creatininemia and blood urea nitrogen (BUN) levels in control and glycerol-treated mice 48 hours and 8 days after treatment. (A) 48 hours or (B) 8 days after glycerol or saline injection (n=5 per group).

271x240mm (96 x 96 DPI)

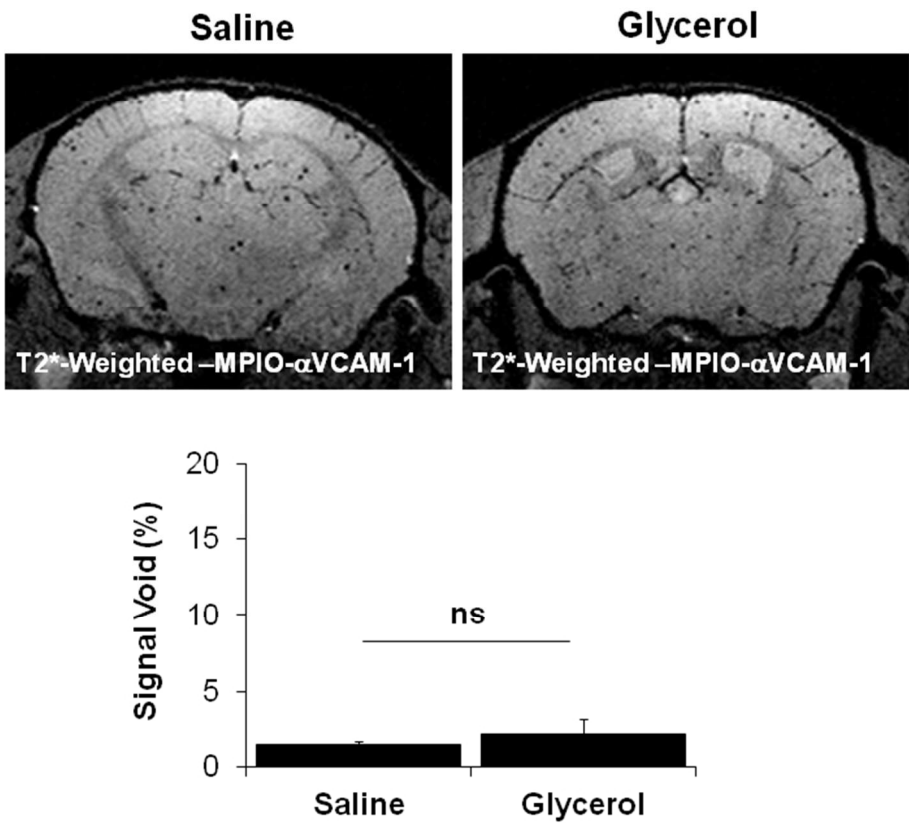


Supplementary Figure 7. Number of VCAM-1 positive vessels in the kidneys and brains of control (saline) and glycerol-treated mice. (A) In Kidney and (B) Brain from saline and glycerol-treated mice (48 hours) (n=5 per group).
267x234mm (96 x 96 DPI)

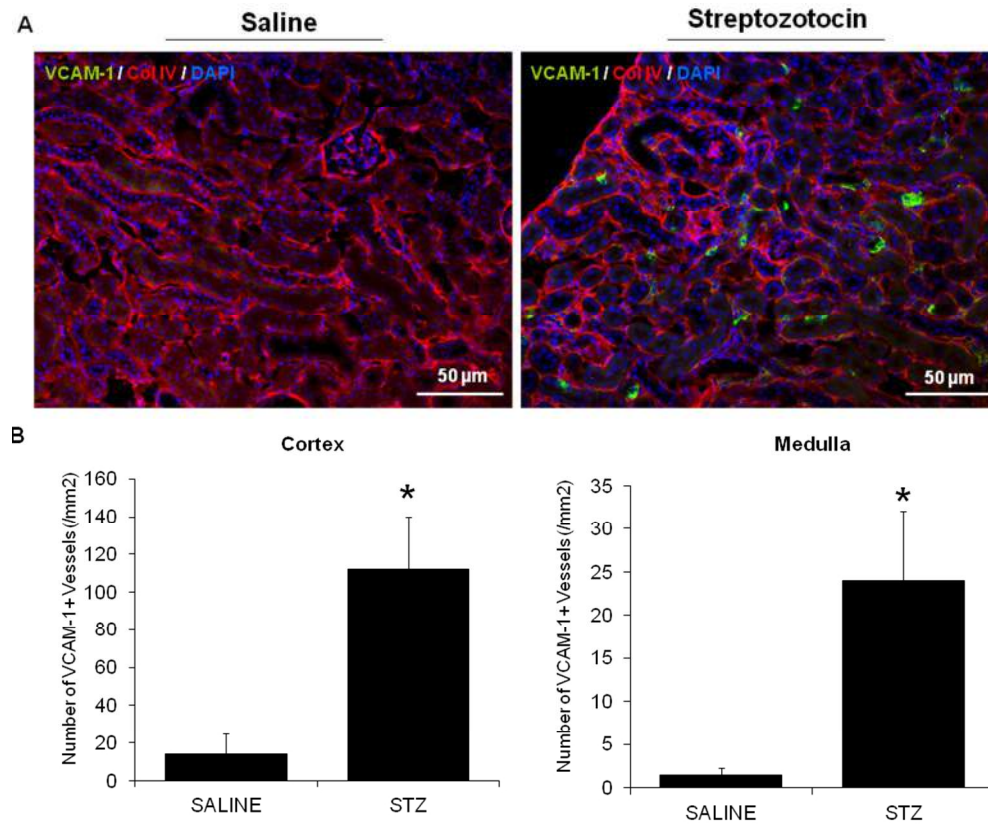


Supplementary Figure 8. VCAM-1 overexpression in glycerol-treated mice is extra-glomerular. Representative immunohistological images of the kidney cortex 48 hours after glycerol treatment. VCAM-1 expression is presented in Green. Morphology of tissue is assessed with Collagen type IV (in red) and DAPI (in Blue).

350x101mm (96 x 96 DPI)

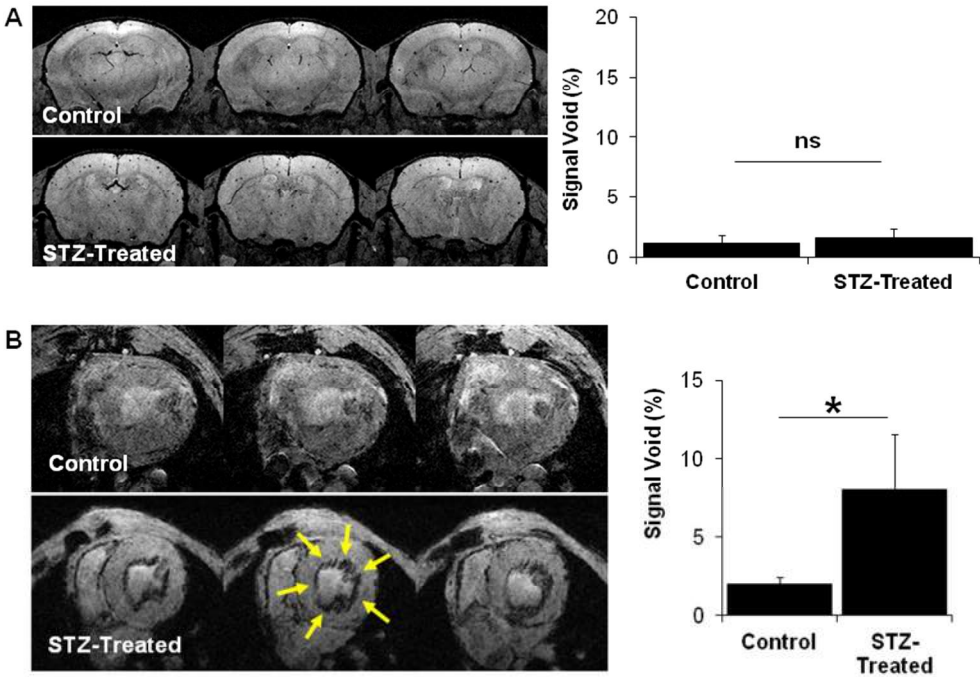


Supplementary Figure 9. Lack of VCAM-1 overexpression in the brain of glycerol-treated mice. Top: Representative T2*-weighted brain images of saline and glycerol-treated mice after MPIO- α VCAM-1 administration. Bottom: Corresponding quantification (n=5 per group).
203x168mm (96 x 96 DPI)

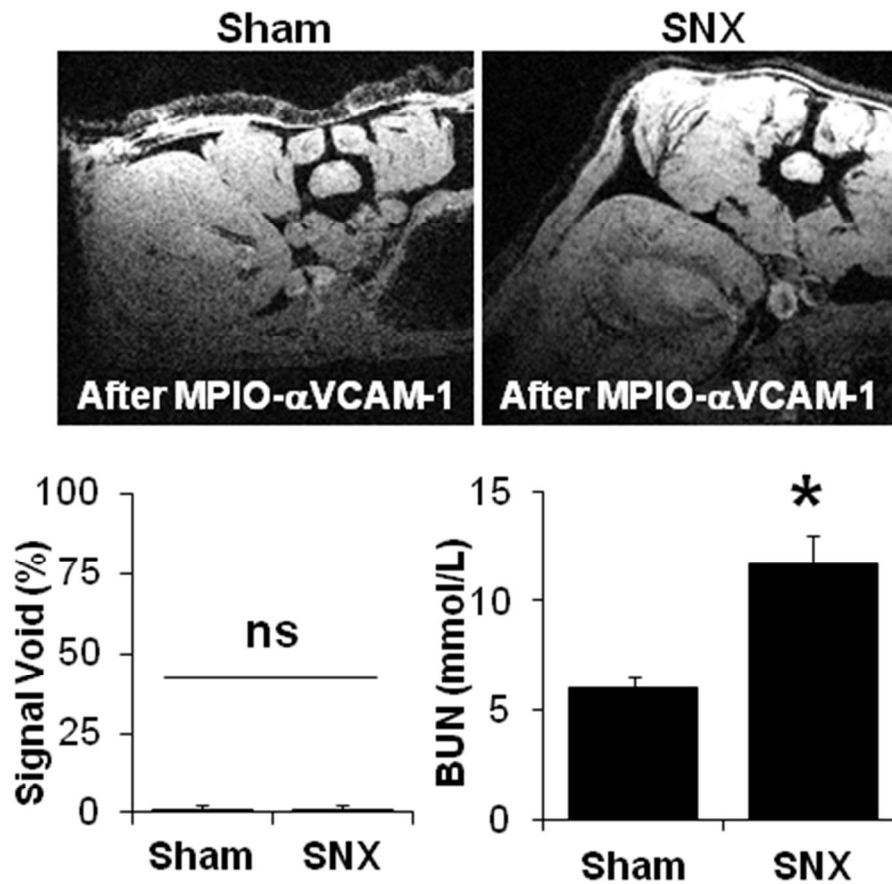


Supplementary Figure 10. Streptozotocin triggered diabetes mellitus induces VCAM-1 overexpression. (A) Representative immunohistological image of VCAM-1 expression (Green) in the kidneys of saline and STZ-treated mice 8 weeks after injection. (B) Corresponding quantification (n=5 per group). Collagen type IV (Red) and DAPI (Blue) were used to assess renal tissue morphology, which was similar in the two groups.

278x231mm (96 x 96 DPI)



Supplementary Figure 11. Streptozotocin triggered diabetes mellitus induces VCAM-1 overexpression in the heart but not in the brain. (A) Left: Representative T2*-weighted images of the brains from control and STZ-treated mice after MPIO- α VCAM-1 administration. Right: Corresponding quantification (n=5). (B) Left: Representative T2*-weighted images of the hearts from control and STZ-treated mice after MPIO- α VCAM-1 administration. Yellow arrows indicate MPIO- α VCAM-1 induced signal voids in the endocardium of STZ-treated mice. Right: Corresponding quantification (n=5 per group).
246x171mm (96 x 96 DPI)



Supplementary Figure 12. Chronic kidney disease (CKD) does not induce VCAM-1 overexpression. Top: Representative T2*-weighted images of the kidneys of subtotal nephrectomized mice after MPIO- α VCAM-1 administration. Bottom: Left, Corresponding quantification (n=5 per group). Right, kidney function assessed with Blood Urea Nitrogen (BUN) level (n=6 per group). *p<0.05 vs control/saline. 122x119mm (96 x 96 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Ultra-sensitive molecular MRI of endothelial cell activation in acute and chronic kidney injuries

Supplementary Data

- Supplementary Figure Legends 1 to 12.

Supplementary Figure 1. LPS induces overexpression of VCAM-1 in the kidney, brain and heart. Left: Representative immunohistological images of VCAM-1 in the kidneys, brain and heart of saline and LPS-treated mice (1 mg/kg, 24 hours after i.p. injection). Right: Corresponding quantification (n=3 per group). Since autofluorescence prevents reliable analysis of VCAM-1+ vessels in the cardiac microcirculation, only large vessels (>20 μ m) were considered in the analysis.

Supplementary Figure 2. A single MPIO- α VCAM-1 injection allows multiple organ imaging: exemple of the brain. (A) Top: Representative T2*-weighted images of the brain from control and LPS-treated mice (1 mg/kg) after MPIO- α VCAM-1 administration. Bottom: Corresponding quantification (n=3). (B) Representative images of MPIO- α VCAM-1 inside VCAM-1⁺ vessels in the brain using immunofluorescence (top) and brightfield microscopy (bottom). The yellow arrows indicate MPIO- α VCAM-1 localization. MPIOs are autofluorescent in green.

Supplementary Figure 3. A single MPIO- α VCAM-1 injection allows multiple organ imaging: exemple of the heart. (A) Representative T2*-weighted images of the heart from LPS-treated mice (1 mg/kg) before and after MPIO- α VCAM-1 administration. (B) Corresponding quantification (n=3 per group). (C) Immunohistological images of MPIO- α VCAM-1 in the heart endothelium (left) and endocardium (right). Green detects autofluorescence and/or VCAM-1, Red is collagen type IV and Blue is DAPI. The yellow arrows indicate MPIO- α VCAM-1 localization.

Supplementary Figure 4. Non-targeted MPIO-IgG does not induce signal void in the kidneys of LPS-treated mice. Top: Representative T2* weighted images of the right kidney of LPS-treated mice before (left) and after (right) MPIO-IgG injection. Bottom: Corresponding quantification (n=4 per group).

Supplementary Figure 5. Non-targeted MPIO-IgG does not induce signal void in the heart of LPS-treated mice. Top: Representative T2* weighted images of the heart of LPS-treated mice before (top) and after (bottom) MPIO-IgG injection. Bottom: Corresponding quantification (n=4 per group).

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Supplementary Figure 6. Creatininemia and blood urea nitrogen (BUN) levels in control and glycerol-treated mice 48 hours and 8 days after treatment. (A) 48 hours or (B) 8 days after glycerol or saline injection (n=5 per group).

Supplementary Figure 7. Number of VCAM-1 positive vessels in the kidneys and brains of control (saline) and glycerol-treated mice. (A) In Kidney and (B) Brain from saline and glycerol-treated mice (48 hours) (n=5 per group).

Supplementary Figure 8. VCAM-1 overexpression in glycerol-treated mice is extra-glomerular. Representative immunohistological images of the kidney cortex 48 hours after glycerol treatment. VCAM-1 expression is presented in Green. Morphology of tissue is assessed with Collagen type IV (in red) and DAPI (in Blue).

Supplementary Figure 9. Lack of VCAM-1 overexpression in the brain of glycerol-treated mice. Top: Representative T2*-weighted brain images of saline and glycerol-treated mice after MPIO- α VCAM-1 administration. Bottom: Corresponding quantification (n=5 per group).

Supplementary Figure 10. Streptozotocin triggered diabetes mellitus induces VCAM-1 overexpression. (A) Representative immunohistological image of VCAM-1 expression (Green) in the kidneys of saline and STZ-treated mice 8 weeks after injection. (B) Corresponding quantification (n=5 per group). Collagen type IV (Red) and DAPI (Blue) were used to assess renal tissue morphology, which was similar in the two groups.

Supplementary Figure 11. Streptozotocin triggered diabetes mellitus induces VCAM-1 overexpression in the heart but not in the brain. (A) Left: Representative T2*-weighted images of the brains from control and STZ-treated mice after MPIO- α VCAM-1 administration. Right: Corresponding quantification (n=5). (B) Left: Representative T2*-weighted images of the hearts from control and STZ-treated mice after MPIO- α VCAM-1 administration. Yellow arrows indicate MPIO- α VCAM-1 induced signal voids in the endocardium of STZ-treated mice. Right: Corresponding quantification (n=5 per group).

Supplementary Figure 12. Chronic kidney disease (CKD) does not induce VCAM-1 overexpression. Top: Representative T2*-weighted images of the kidneys of subtotal nephrectomized mice mice after MPIO- α VCAM-1 administration. Bottom: Left, Corresponding quantification (n=5 per group). Right, kidney function assessed with Blood Urea Nitrogen (BUN) level (n=6 per group). *p<0.05 vs control/saline.

7.3 Discussion

7.3.1 Limites de l'étude

7.3.1.1 Absence de détection de VCAM-1 en situation chronique

En situation de réduction néphronique (modèle 5/6^{ème}), à 17 semaines dans nos conditions expérimentales, la protéine n'est pas retrouvée surexprimée. Cependant, dans une étude, il est rapporté que la transcription de VCAM-1 augmente progressivement entre 8 et 12 semaines [241]. Cette discordance pourrait s'expliquer par une différence d'espèce (rat/souris), ou une modification dans la traduction (l'ARN étant produit, mais pas la protéine). Dans le fond, l'absence de détection de VCAM-1 en situation chronique ne contre-indique pas son utilisation en tant que marqueur. Au contraire, l'absence de détection permet de pouvoir déceler un événement aigu intercurrent dans l'histoire naturelle de la néphropathie (exemple : épisode d'ischémie).

7.3.1.2 Caractère biodégradable des MPIOs

Dans leur formulation actuelle, les MPIOs ne sont pas dégradables. Les études de biodistribution décrites par Akhtar indiquent une absence de stockage par les reins ou les poumons. Le foie et la rate semblent participer à l'élimination des particules [240]. Heureusement, la mise au point de MPIOs biodégradables semble accessible [242, 243], et il n'est pas exclu que leur commercialisation soit disponible prochainement.

7.3.2 Intérêt clinique

L'IRM présente l'avantage d'être non irradiante et de pouvoir être répétée dans le temps. Cette technique couplée aux MPIOs présente des caractéristiques compatibles avec une translation chez l'homme :

- faible dose de fer injecté (1mg/kg),
- délai court entre l'administration du produit et l'acquisition,
- faible temps d'acquisition (40 secondes pour une faible résolution, 8 minutes pour une forte résolution).

Récemment, une étude a montré qu'il était possible de détecter des changements dans l'oxygénation et la perfusion rénale dans l'ARA (modèle murine de rhabdomyolyse) et la MRC (induite par l'adénine) à l'aide de deux modes d'acquisition en IRM sans avoir recours à des agents de contraste *hemodynamic response imaging* et *true fast imaging with steady-state precession* [244].

On pourrait imaginer l'imagerie moléculaire en tant que complément d'étude de la composante « inflammatoire » dans certaines situations cliniques délicates.

7.4 Conclusion

L'imagerie moléculaire ciblant VCAM-1 est une technique qui peut s'appliquer à l'étude du tissu rénal *in vivo*. Il serait intéressant de développer des études de faisabilité une fois la biocompatibilité améliorée. En parallèle, des études cliniques sont nécessaires pour préciser si l'expression de VCAM-1 est associée à la progression de la maladie chez l'homme.

8. Bibliographie

1. Bellomo, R., et al., *Acute renal failure - definition, outcome measures, animal models, fluid therapy and information technology needs: the Second International Consensus Conference of the Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) Group*. Critical care, 2004. **8**(4): p. R204-12.
2. Mehta, R.L., et al., *Acute Kidney Injury Network: report of an initiative to improve outcomes in acute kidney injury*. Critical care, 2007. **11**(2): p. R31.
3. KDIGO, *Section 2: AKI Definition*. Kidney international supplements, 2012. **2**(1): p. 19-36.
4. Bellomo, R., J.A. Kellum, and C. Ronco, *Acute kidney injury*. Lancet, 2012. **380**(9843): p. 756-66.
5. Xue, J.L., et al., *Incidence and mortality of acute renal failure in Medicare beneficiaries, 1992 to 2001*. Journal of the American Society of Nephrology : JASN, 2006. **17**(4): p. 1135-42.
6. Hsu, R.K., et al., *Temporal changes in incidence of dialysis-requiring AKI*. Journal of the American Society of Nephrology : JASN, 2013. **24**(1): p. 37-42.
7. Uchino, S., et al., *Acute renal failure in critically ill patients: a multinational, multicenter study*. JAMA : the journal of the American Medical Association, 2005. **294**(7): p. 813-8.
8. Coresh, J., et al., *Chronic kidney disease awareness, prevalence, and trends among U.S. adults, 1999 to 2000*. Journal of the American Society of Nephrology : JASN, 2005. **16**(1): p. 180-8.
9. Hallan, S.I., et al., *International comparison of the relationship of chronic kidney disease prevalence and ESRD risk*. Journal of the American Society of Nephrology : JASN, 2006. **17**(8): p. 2275-84.
10. Stengel, B., et al., *Epidémiologie de l'insuffisance rénale chronique en France*. Presse Médicale, 2007. **36**(12P2): p. 1811.
11. Biomédecine, A.d.l., *Rapport annuel 2012*. REIN, 2012. **Réseau Epidémiologie Information Néphrologie**(registre français des traitements de suppléance de l'insuffisance rénale chronique).
12. Liano, F., et al., *Long-term outcome of acute tubular necrosis: a contribution to its natural history*. Kidney international, 2007. **71**(7): p. 679-86.
13. Vikse, B.E., et al., *Preeclampsia and the risk of end-stage renal disease*. The New England journal of medicine, 2008. **359**(8): p. 800-9.
14. Chawla, L.S., et al., *Acute kidney injury and chronic kidney disease as interconnected syndromes*. The New England journal of medicine, 2014. **371**(1): p. 58-66.
15. Chawla, L.S. and P.L. Kimmel, *Acute kidney injury and chronic kidney disease: an integrated clinical syndrome*. Kidney international, 2012. **82**(5): p. 516-24.
16. Thakar, C.V., et al., *Acute kidney injury episodes and chronic kidney disease risk in diabetes mellitus*. Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN, 2011. **6**(11): p. 2567-72.
17. Ishani, A., et al., *Acute kidney injury increases risk of ESRD among elderly*. Journal of the American Society of Nephrology : JASN, 2009. **20**(1): p. 223-8.

18. Allgren, R.L., et al., *Anaritide in acute tubular necrosis. Auriculin Anaritide Acute Renal Failure Study Group*. The New England journal of medicine, 1997. **336**(12): p. 828-34.
19. Hirschberg, R., et al., *Multicenter clinical trial of recombinant human insulin-like growth factor I in patients with acute renal failure*. Kidney international, 1999. **55**(6): p. 2423-32.
20. Endre, Z.H., et al., *Early intervention with erythropoietin does not affect the outcome of acute kidney injury (the EARLYARF trial)*. Kidney international, 2010. **77**(11): p. 1020-30.
21. Kale, S., et al., *Bone marrow stem cells contribute to repair of the ischemically injured renal tubule*. The Journal of clinical investigation, 2003. **112**(1): p. 42-9.
22. Togel, F.E. and C. Westenfelder, *Kidney protection and regeneration following acute injury: progress through stem cell therapy*. American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation, 2012. **60**(6): p. 1012-22.
23. Fioretto, P., et al., *Reversal of lesions of diabetic nephropathy after pancreas transplantation*. The New England journal of medicine, 1998. **339**(2): p. 69-75.
24. Remuzzi, A., et al., *ACE inhibition reduces glomerulosclerosis and regenerates glomerular tissue in a model of progressive renal disease*. Kidney international, 2006. **69**(7): p. 1124-30.
25. Ruggenenti, P., et al., *In chronic nephropathies prolonged ACE inhibition can induce remission: dynamics of time-dependent changes in GFR. Investigators of the GISEN Group. Gruppo Italiano Studi Epidemiologici in Nefrologia*. Journal of the American Society of Nephrology : JASN, 1999. **10**(5): p. 997-1006.
26. Harris, R.C., *Growth factors and cytokines in acute renal failure*. Advances in renal replacement therapy, 1997. **4**(2 Suppl 1): p. 43-53.
27. Zeng, F., A.B. Singh, and R.C. Harris, *The role of the EGF family of ligands and receptors in renal development, physiology and pathophysiology*. Experimental cell research, 2009. **315**(4): p. 602-10.
28. Honda, N., et al., *Acquired resistance to acute renal failure*. Kidney international, 1987. **31**(6): p. 1233-8.
29. Zager, R.A., et al., *Responses of the ischemic acute renal failure kidney to additional ischemic events*. Kidney international, 1984. **26**(5): p. 689-700.
30. Zager, R.A., et al., *Post-ischemic acute renal failure protects proximal tubules from O₂ deprivation injury, possibly by inducing uremia*. Kidney international, 1994. **45**(6): p. 1760-8.
31. Zager, R.A., *'Biologic memory' in response to acute kidney injury: cytoresistance, toll-like receptor hyper-responsiveness and the onset of progressive renal disease*. Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association, 2013. **28**(8): p. 1985-93.
32. Bechtel, W., et al., *Methylation determines fibroblast activation and fibrogenesis in the kidney*. Nature medicine, 2010. **16**(5): p. 544-50.
33. Kurts, C., et al., *The immune system and kidney disease: basic concepts and clinical implications*. Nature reviews. Immunology, 2013. **13**(10): p. 738-53.
34. Allam, R., et al., *Histones from dying renal cells aggravate kidney injury via TLR2 and TLR4*. Journal of the American Society of Nephrology : JASN, 2012. **23**(8): p. 1375-88.

35. Pelegrin, P. and A. Surprenant, *Dynamics of macrophage polarization reveal new mechanism to inhibit IL-1 β release through pyrophosphates*. The EMBO journal, 2009. **28**(14): p. 2114-27.
36. Goncalves, R.G., et al., *The role of purinergic P2X7 receptors in the inflammation and fibrosis of unilateral ureteral obstruction in mice*. Kidney international, 2006. **70**(9): p. 1599-606.
37. Wang, C., et al., *Quercetin and allopurinol ameliorate kidney injury in STZ-treated rats with regulation of renal NLRP3 inflammasome activation and lipid accumulation*. PloS one, 2012. **7**(6): p. e38285.
38. Gil, N., et al., *Heparanase is essential for the development of diabetic nephropathy in mice*. Diabetes, 2012. **61**(1): p. 208-16.
39. Saemann, M.D., et al., *Tamm-Horsfall glycoprotein links innate immune cell activation with adaptive immunity via a Toll-like receptor-4-dependent mechanism*. The Journal of clinical investigation, 2005. **115**(2): p. 468-75.
40. Vilaysane, A., et al., *The NLRP3 inflammasome promotes renal inflammation and contributes to CKD*. Journal of the American Society of Nephrology : JASN, 2010. **21**(10): p. 1732-44.
41. Anders, H.J. and L. Schaefer, *Beyond Tissue Injury-Damage-Associated Molecular Patterns, Toll-Like Receptors, and Inflammasomes Also Drive Regeneration and Fibrosis*. Journal of the American Society of Nephrology : JASN, 2014. **25**(7): p. 1387-1400.
42. Chen, G.Y. and G. Nunez, *Sterile inflammation: sensing and reacting to damage*. Nature reviews. Immunology, 2010. **10**(12): p. 826-37.
43. Davis, B.K. and J.P. Ting, *NLRP3 has a sweet tooth*. Nature immunology, 2010. **11**(2): p. 105-6.
44. Meng, X.M., D.J. Nikolic-Paterson, and H.Y. Lan, *Inflammatory processes in renal fibrosis*. Nature reviews. Nephrology, 2014.
45. Snelgrove, S.L., et al., *Renal dendritic cells adopt a pro-inflammatory phenotype in obstructive uropathy to activate T cells but do not directly contribute to fibrosis*. The American journal of pathology, 2012. **180**(1): p. 91-103.
46. Gordon, S., *Elie Metchnikoff: father of natural immunity*. European journal of immunology, 2008. **38**(12): p. 3257-64.
47. Ginhoux, F. and S. Jung, *Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis*. Nature reviews. Immunology, 2014. **14**(6): p. 392-404.
48. Shi, C. and E.G. Pamer, *Monocyte recruitment during infection and inflammation*. Nature reviews. Immunology, 2011. **11**(11): p. 762-74.
49. Jia, T., et al., *Additive roles for MCP-1 and MCP-3 in CCR2-mediated recruitment of inflammatory monocytes during Listeria monocytogenes infection*. Journal of immunology, 2008. **180**(10): p. 6846-53.
50. Ginhoux, F., et al., *Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages*. Science, 2010. **330**(6005): p. 841-5.
51. Schulz, C., et al., *A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells*. Science, 2012. **336**(6077): p. 86-90.
52. Jenkins, S.J., et al., *Local macrophage proliferation, rather than recruitment from the blood, is a signature of TH2 inflammation*. Science, 2011. **332**(6035): p. 1284-8.
53. Murray, P.J. and T.A. Wynn, *Protective and pathogenic functions of macrophage subsets*. Nature reviews. Immunology, 2011. **11**(11): p. 723-37.

54. van den Berg, T.K. and G. Kraal, *A function for the macrophage F4/80 molecule in tolerance induction*. Trends in immunology, 2005. **26**(10): p. 506-9.
55. Rosas, M., et al., *The myeloid 7/4-antigen defines recently generated inflammatory macrophages and is synonymous with Ly-6B*. Journal of leukocyte biology, 2010. **88**(1): p. 169-80.
56. Taylor, P.R., et al., *Pattern recognition receptors and differentiation antigens define murine myeloid cell heterogeneity ex vivo*. European journal of immunology, 2003. **33**(8): p. 2090-7.
57. Guilleams, M., et al., *The function of Fcγ receptors in dendritic cells and macrophages*. Nature reviews. Immunology, 2014. **14**(2): p. 94-108.
58. Lawrence, T. and G. Natoli, *Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity*. Nature reviews. Immunology, 2011. **11**(11): p. 750-61.
59. Mantovani, A., et al., *The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization*. Trends in immunology, 2004. **25**(12): p. 677-86.
60. Cassetta, L., E. Cassol, and G. Poli, *Macrophage polarization in health and disease*. TheScientificWorldJournal, 2011. **11**: p. 2391-402.
61. Liu, G. and E. Abraham, *MicroRNAs in immune response and macrophage polarization*. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 2013. **33**(2): p. 170-7.
62. Mosser, D.M. and J.P. Edwards, *Exploring the full spectrum of macrophage activation*. Nature reviews. Immunology, 2008. **8**(12): p. 958-69.
63. Foster, S.L., D.C. Hargreaves, and R. Medzhitov, *Gene-specific control of inflammation by TLR-induced chromatin modifications*. Nature, 2007. **447**(7147): p. 972-8.
64. Biswas, S.K. and E. Lopez-Collazo, *Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance*. Trends in immunology, 2009. **30**(10): p. 475-87.
65. McWhorter, F.Y., et al., *Modulation of macrophage phenotype by cell shape*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2013. **110**(43): p. 17253-8.
66. Jaguin, M., et al., *Polarization profiles of human M-CSF-generated macrophages and comparison of M1-markers in classically activated macrophages from GM-CSF and M-CSF origin*. Cellular immunology, 2013. **281**(1): p. 51-61.
67. Martinez, F.O., et al., *Genetic programs expressed in resting and IL-4 alternatively activated mouse and human macrophages: similarities and differences*. Blood, 2013. **121**(9): p. e57-69.
68. Murray, P.J. and T.A. Wynn, *Obstacles and opportunities for understanding macrophage polarization*. Journal of leukocyte biology, 2011. **89**(4): p. 557-63.
69. Raes, G., et al., *Arginase-1 and Ym1 are markers for murine, but not human, alternatively activated myeloid cells*. Journal of immunology, 2005. **174**(11): p. 6561; author reply 6561-2.
70. Rogers, N.M., et al., *Dendritic cells and macrophages in the kidney: a spectrum of good and evil*. Nature reviews. Nephrology, 2014.
71. Chow, A., B.D. Brown, and M. Merad, *Studying the mononuclear phagocyte system in the molecular age*. Nature reviews. Immunology, 2011. **11**(11): p. 788-98.
72. Holdsworth, S.R., T.J. Neale, and C.B. Wilson, *Abrogation of macrophage-dependent injury in experimental glomerulonephritis in the rabbit. Use of an antimacrophage serum*. The Journal of clinical investigation, 1981. **68**(3): p. 686-98.

73. Lehenkari, P.P., et al., *Further insight into mechanism of action of clodronate: inhibition of mitochondrial ADP/ATP translocase by a nonhydrolyzable, adenine-containing metabolite*. Molecular pharmacology, 2002. **61**(5): p. 1255-62.
74. Wang, H., et al., *Key role of macrophages in the pathogenesis of CD18 hypomorphic murine model of psoriasis*. The Journal of investigative dermatology, 2009. **129**(5): p. 1100-14.
75. Getts, D.R., et al., *Therapeutic inflammatory monocyte modulation using immune-modifying microparticles*. Science translational medicine, 2014. **6**(219): p. 219ra7.
76. Wang, Y., et al., *Partial depletion of macrophages by ED7 reduces renal injury in Adriamycin nephropathy*. Nephrology, 2005. **10**(5): p. 470-7.
77. Jiang, N., C.F. Reich, 3rd, and D.S. Pisetsky, *Role of macrophages in the generation of circulating blood nucleosomes from dead and dying cells*. Blood, 2003. **102**(6): p. 2243-50.
78. Kinsey, G.R., *Macrophage dynamics in AKI to CKD progression*. Journal of the American Society of Nephrology : JASN, 2014. **25**(2): p. 209-11.
79. Lech, M., et al., *Macrophage phenotype controls long-term AKI outcomes--kidney regeneration versus atrophy*. Journal of the American Society of Nephrology : JASN, 2014. **25**(2): p. 292-304.
80. Hume, D.A. and S. Gordon, *Mononuclear phagocyte system of the mouse defined by immunohistochemical localization of antigen F4/80. Identification of resident macrophages in renal medullary and cortical interstitium and the juxtaglomerular complex*. The Journal of experimental medicine, 1983. **157**(5): p. 1704-9.
81. Kawakami, T., et al., *Resident Renal Mononuclear Phagocytes Comprise Five Discrete Populations with Distinct Phenotypes and Functions*. Journal of immunology, 2013.
82. Hochheiser, K., et al., *Exclusive CX3CR1 dependence of kidney DCs impacts glomerulonephritis progression*. The Journal of clinical investigation, 2013. **123**(10): p. 4242-54.
83. Cao, Q., et al., *Renal F4/80+CD11c+ Mononuclear Phagocytes Display Phenotypic and Functional Characteristics of Macrophages in Health and in Adriamycin Nephropathy*. Journal of the American Society of Nephrology : JASN, 2014.
84. Awad, A.S., et al., *Monocyte/macrophage chemokine receptor CCR2 mediates diabetic renal injury*. American journal of physiology. Renal physiology, 2011. **301**(6): p. F1358-66.
85. Fujii, K., I. Manabe, and R. Nagai, *Renal collecting duct epithelial cells regulate inflammation in tubulointerstitial damage in mice*. The Journal of clinical investigation, 2011. **121**(9): p. 3425-41.
86. Iwata, Y., et al., *Aberrant macrophages mediate defective kidney repair that triggers nephritis in lupus-susceptible mice*. Journal of immunology, 2012. **188**(9): p. 4568-80.
87. Hancock, W.W., N.M. Thomson, and R.C. Atkins, *Composition of interstitial cellular infiltrate identified by monoclonal antibodies in renal biopsies of rejecting human renal allografts*. Transplantation, 1983. **35**(5): p. 458-63.
88. Hoffmann, U., et al., *Impact of chemokine receptor CX3CR1 in human renal allograft rejection*. Transplant immunology, 2010. **23**(4): p. 204-8.
89. Yoshimoto, K., et al., *CD68 and MCP-1/CCR2 expression of initial biopsies reflect the outcomes of membranous nephropathy*. Nephron. Clinical practice, 2004. **98**(1): p. c25-34.

90. Mrug, M., et al., *Renal macrophages in autosomal recessive polycystic kidney disease*. Nephrology, 2013. **18**(11): p. 746.
91. Silva, G.E., et al., *Renal macrophage infiltration is associated with a poor outcome in IgA nephropathy*. Clinics, 2012. **67**(7): p. 697-703.
92. Zhang, M.Z., et al., *CSF-1 signaling mediates recovery from acute kidney injury*. The Journal of clinical investigation, 2012. **122**(12): p. 4519-32.
93. Jang, H.S., et al., *Bone marrow-derived cells play a major role in kidney fibrosis via proliferation and differentiation in the infiltrated site*. Biochimica et biophysica acta, 2013. **1832**(6): p. 817-25.
94. You, H., et al., *Macrophages directly mediate diabetic renal injury*. American journal of physiology. Renal physiology, 2013. **305**(12): p. F1719-27.
95. Day, Y.J., et al., *Renal ischemia-reperfusion injury and adenosine 2A receptor-mediated tissue protection: role of macrophages*. American journal of physiology. Renal physiology, 2005. **288**(4): p. F722-31.
96. Jo, S.K., et al., *Macrophages contribute to the initiation of ischaemic acute renal failure in rats*. Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association, 2006. **21**(5): p. 1231-9.
97. Lee, S., et al., *Distinct macrophage phenotypes contribute to kidney injury and repair*. Journal of the American Society of Nephrology : JASN, 2011. **22**(2): p. 317-26.
98. Kitamoto, K., et al., *Effects of liposome clodronate on renal leukocyte populations and renal fibrosis in murine obstructive nephropathy*. Journal of pharmacological sciences, 2009. **111**(3): p. 285-92.
99. Chaves, L.D., et al., *Contrasting Effects of Systemic Monocyte/Macrophage and CD4(+) T Cell Depletion in a Reversible Ureteral Obstruction Mouse Model of Chronic Kidney Disease*. Clinical & developmental immunology, 2013. **2013**: p. 836989.
100. Fet, N.G., et al., *Reduction of activated macrophages after ischaemia-reperfusion injury diminishes oxidative stress and ameliorates renal damage*. Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association, 2012. **27**(8): p. 3149-55.
101. Lin, S.L., et al., *Bone marrow Ly6Chigh monocytes are selectively recruited to injured kidney and differentiate into functionally distinct populations*. Journal of immunology, 2009. **183**(10): p. 6733-43.
102. Machida, Y., et al., *Renal fibrosis in murine obstructive nephropathy is attenuated by depletion of monocyte lineage, not dendritic cells*. Journal of pharmacological sciences, 2010. **114**(4): p. 464-73.
103. Wang, Y., et al., *Ex vivo programmed macrophages ameliorate experimental chronic inflammatory renal disease*. Kidney international, 2007. **72**(3): p. 290-9.
104. Ryu, M., et al., *Bacterial CpG-DNA accelerates Alport glomerulosclerosis by inducing an M1 macrophage phenotype and tumor necrosis factor-alpha-mediated podocyte loss*. Kidney international, 2011. **79**(2): p. 189-98.
105. Ikezumi, Y., et al., *Adoptive transfer studies demonstrate that macrophages can induce proteinuria and mesangial cell proliferation*. Kidney international, 2003. **63**(1): p. 83-95.
106. Wang, Z., et al., *Inhibition of Macrophage Migration Inhibitory Factor Reduces Diabetic Nephropathy in Type II Diabetes Mice*. Inflammation, 2014.

107. Tan, T.K., et al., *Matrix metalloproteinase-9 of tubular and macrophage origin contributes to the pathogenesis of renal fibrosis via macrophage recruitment through osteopontin cleavage*. Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology, 2013. **93**(4): p. 434-49.
108. Kluger, M.A., et al., *Leukocyte-derived MMP9 is crucial for the recruitment of proinflammatory macrophages in experimental glomerulonephritis*. Kidney international, 2013. **83**(5): p. 865-77.
109. Godwin, J.W., A.R. Pinto, and N.A. Rosenthal, *Macrophages are required for adult salamander limb regeneration*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2013. **110**(23): p. 9415-20.
110. Nishida, M., et al., *Adoptive transfer of macrophages ameliorates renal fibrosis in mice*. Biochemical and biophysical research communications, 2005. **332**(1): p. 11-6.
111. Zheng, D., et al., *Transfused macrophages ameliorate pancreatic and renal injury in murine diabetes mellitus*. Nephron. Experimental nephrology, 2011. **118**(4): p. e87-99.
112. Jung, M., et al., *Infusion of IL-10-expressing cells protects against renal ischemia through induction of lipocalin-2*. Kidney international, 2012. **81**(10): p. 969-82.
113. Tadagavadi, R.K. and W.B. Reeves, *Renal dendritic cells ameliorate nephrotoxic acute kidney injury*. Journal of the American Society of Nephrology : JASN, 2010. **21**(1): p. 53-63.
114. Yokoo, T., *Inflamed site-specific delivery of bone marrow-derived cells carrying IL-1Ra*. Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association, 2002. **17 Suppl 9**: p. 91-3.
115. Zhang, J.D., et al., *Type 1 angiotensin receptors on macrophages ameliorate IL-1 receptor-mediated kidney fibrosis*. The Journal of clinical investigation, 2014. **124**(5): p. 2198-203.
116. Kobayashi, H., et al., *Myeloid cell-derived hypoxia-inducible factor attenuates inflammation in unilateral ureteral obstruction-induced kidney injury*. Journal of immunology, 2012. **188**(10): p. 5106-15.
117. Lech, M., et al., *Resident dendritic cells prevent postischemic acute renal failure by help of single Ig IL-1 receptor-related protein*. Journal of immunology, 2009. **183**(6): p. 4109-18.
118. Lassen, S., et al., *Ischemia reperfusion induces IFN regulatory factor 4 in renal dendritic cells, which suppresses postischemic inflammation and prevents acute renal failure*. Journal of immunology, 2010. **185**(3): p. 1976-83.
119. Lin, S.L., et al., *Macrophage Wnt7b is critical for kidney repair and regeneration*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2010. **107**(9): p. 4194-9.
120. Susnik, N., et al., *Ablation of proximal tubular suppressor of cytokine signaling 3 enhances tubular cell cycling and modifies macrophage phenotype during acute kidney injury*. Kidney international, 2014. **85**(6): p. 1357-68.
121. Karihaloo, A., et al., *Macrophages promote cyst growth in polycystic kidney disease*. Journal of the American Society of Nephrology : JASN, 2011. **22**(10): p. 1809-14.
122. Swenson-Fields, K.I., et al., *Macrophages promote polycystic kidney disease progression*. Kidney international, 2013. **83**(5): p. 855-64.

123. Madsen, D.H., et al., *M2-like macrophages are responsible for collagen degradation through a mannose receptor-mediated pathway*. The Journal of cell biology, 2013. **202**(6): p. 951-66.
124. Kushiyaama, T., et al., *Alteration in the phenotype of macrophages in the repair of renal interstitial fibrosis in mice*. Nephrology, 2011. **16**(5): p. 522-35.
125. Cao, Q., et al., *IL-10/TGF-beta-modified macrophages induce regulatory T cells and protect against adriamycin nephrosis*. Journal of the American Society of Nephrology : JASN, 2010. **21**(6): p. 933-42.
126. Takabatake, Y., et al., *A superagonistic monoclonal antibody for CD28 ameliorates crescentic glomerulonephritis in wistar-kyoto rats*. Molecular medicine, 2011. **17**(7-8): p. 686-96.
127. Griffin, M.D., *Mononuclear phagocyte depletion strategies in models of acute kidney disease: what are they trying to tell us?* Kidney international, 2012. **82**(8): p. 835-7.
128. Ferenbach, D.A., et al., *Macrophage/monocyte depletion by clodronate, but not diphtheria toxin, improves renal ischemia/reperfusion injury in mice*. Kidney international, 2012. **82**(8): p. 928-33.
129. Dessing, M.C., et al., *The calcium-binding protein complex S100A8/A9 has a crucial role in controlling macrophage-mediated renal repair following ischemia/reperfusion*. Kidney international, 2014.
130. Hutchinson, J.A., et al., *Human regulatory macrophages*. Methods in molecular biology, 2011. **677**: p. 181-92.
131. Hutchinson, J.A., et al., *Cutting Edge: Immunological consequences and trafficking of human regulatory macrophages administered to renal transplant recipients*. Journal of immunology, 2011. **187**(5): p. 2072-8.
132. Cao, Q., et al., *Failed renoprotection by alternatively activated bone marrow macrophages is due to a proliferation-dependent phenotype switch in vivo*. Kidney international, 2014. **85**(4): p. 794-806.
133. Clauss, S., et al., *Ccl2/Mcp-1 blockade reduces glomerular and interstitial macrophages but does not ameliorate renal pathology in collagen4A3-deficient mice with autosomal recessive Alport nephropathy*. The Journal of pathology, 2009. **218**(1): p. 40-7.
134. Darisipudi, M.N., et al., *Dual blockade of the homeostatic chemokine CXCL12 and the proinflammatory chemokine CCL2 has additive protective effects on diabetic kidney disease*. The American journal of pathology, 2011. **179**(1): p. 116-24.
135. Ninichuk, V., et al., *Late onset of Ccl2 blockade with the Spiegelmer mNOX-E36-3'PEG prevents glomerulosclerosis and improves glomerular filtration rate in db/db mice*. The American journal of pathology, 2008. **172**(3): p. 628-37.
136. Kulkarni, O., et al., *Spiegelmer inhibition of CCL2/MCP-1 ameliorates lupus nephritis in MRL-(Fas)lpr mice*. Journal of the American Society of Nephrology : JASN, 2007. **18**(8): p. 2350-8.
137. Sayyed, S.G., et al., *An orally active chemokine receptor CCR2 antagonist prevents glomerulosclerosis and renal failure in type 2 diabetes*. Kidney international, 2011. **80**(1): p. 68-78.
138. Sullivan, T., et al., *CCR2 antagonist CCX140-B provides renal and glycemic benefits in diabetic transgenic human CCR2 knockin mice*. American journal of physiology. Renal physiology, 2013. **305**(9): p. F1288-97.

139. Anders, H.J., et al., *Late onset of treatment with a chemokine receptor CCR1 antagonist prevents progression of lupus nephritis in MRL-Fas(lpr) mice*. Journal of the American Society of Nephrology : JASN, 2004. **15**(6): p. 1504-13.
140. Bignon, A., et al., *CCR1 Inhibition Ameliorates the Progression of Lupus Nephritis in NZB/W Mice*. Journal of immunology, 2013.
141. Rogers, N.M., et al., *Amelioration of renal ischaemia-reperfusion injury by liposomal delivery of curcumin to renal tubular epithelial and antigen-presenting cells*. British journal of pharmacology, 2012. **166**(1): p. 194-209.
142. Vanholder, R., et al., *Rhabdomyolysis*. Journal of the American Society of Nephrology : JASN, 2000. **11**(8): p. 1553-61.
143. Bywaters, E.G. and D. Beall, *Crush Injuries with Impairment of Renal Function*. British medical journal, 1941. **1**(4185): p. 427-32.
144. Bywaters, E.G., et al., *Myohaemoglobin in the urine of air raid casualties with crushing injury*. The Biochemical journal, 1941. **35**(10-11): p. 1164-8.
145. Bosch, X., E. Poch, and J.M. Grau, *Rhabdomyolysis and acute kidney injury*. The New England journal of medicine, 2009. **361**(1): p. 62-72.
146. Ponraj, D. and P. Gopalakrishnakone, *Morphological changes induced by a generalized myotoxin (myoglobinuria-inducing toxin) from the venom of Pseudechis australis (king brown snake) in skeletal muscle and kidney of mice*. Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology, 1995. **33**(11): p. 1453-67.
147. McMahon, G.M., X. Zeng, and S.S. Waikar, *A risk prediction score for kidney failure or mortality in rhabdomyolysis*. JAMA internal medicine, 2013. **173**(19): p. 1821-8.
148. Holt, S.G. and K.P. Moore, *Pathogenesis and treatment of renal dysfunction in rhabdomyolysis*. Intensive care medicine, 2001. **27**(5): p. 803-11.
149. Melli, G., V. Chaudhry, and D.R. Cornblath, *Rhabdomyolysis: an evaluation of 475 hospitalized patients*. Medicine, 2005. **84**(6): p. 377-85.
150. de Meijer, A.R., et al., *Serum creatine kinase as predictor of clinical course in rhabdomyolysis: a 5-year intensive care survey*. Intensive care medicine, 2003. **29**(7): p. 1121-5.
151. Woodrow, G., A.M. Brownjohn, and J.H. Turney, *The clinical and biochemical features of acute renal failure due to rhabdomyolysis*. Renal failure, 1995. **17**(4): p. 467-74.
152. Sever, M.S., et al., *Treatment modalities and outcome of the renal victims of the Marmara earthquake*. Nephron, 2002. **92**(1): p. 64-71.
153. Zhang, L., et al., *The clinical features and outcome of crush patients with acute kidney injury after the Wenchuan earthquake: differences between elderly and younger adults*. Injury, 2012. **43**(9): p. 1470-5.
154. Vanholder, R., et al., *Renal Disaster Relief Task Force in Haiti earthquake*. Lancet, 2010. **375**(9721): p. 1162-3.
155. Phair, J. and L.K. Kayler, *Transplant of kidneys from a small pediatric donor with severe rhabdomyolysis*. Transplantation, 2013. **96**(6): p. e46-7.
156. Caglar, K., et al., *Severe rhabdomyolysis due to malignant hyperthermia during renal transplantation procedure can cause delayed graft function*. American journal of nephrology, 2002. **22**(1): p. 81-3.
157. Joshi, S., et al., *Rhabdomyolysis with acute kidney injury in deceased donors is not a contraindication for kidney donation*. International urology and nephrology, 2012. **44**(4): p. 1107-11.

158. Leaf, D.E., M. Wolf, and L. Stern, *Elevated FGF-23 in a patient with rhabdomyolysis-induced acute kidney injury*. Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association, 2010. **25**(4): p. 1335-7.
159. Sathyan, S., R. Baskharoun, and A.S. Perlman, *Prevention of Recurrent Episodes of Rhabdomyolysis With Tacrolimus in a Transplant Recipient With Myopathy*. American journal of therapeutics, 2013.
160. McCarron, D.A., et al., *Chronic tubulointerstitial nephritis caused by recurrent myoglobinuria*. Archives of internal medicine, 1980. **140**(8): p. 1106-7.
161. Wang, J., et al., *Rhabdomyolysis-induced acute kidney injury under hypoxia and deprivation of food and water*. Kidney & blood pressure research, 2013. **37**(4-5): p. 414-21.
162. Chedru, M.F., R. Baethke, and D.E. Oken, *Renal cortical blood flow and glomerular filtration in myohemoglobinuric acute renal failure*. Kidney international, 1972. **1**(4): p. 232-9.
163. Wrogemann, K. and S.D. Pena, *Mitochondrial calcium overload: A general mechanism for cell-necrosis in muscle diseases*. Lancet, 1976. **1**(7961): p. 672-4.
164. Lathem, W., *The binding of myoglobin by plasma protein*. The Journal of experimental medicine, 1960. **111**: p. 65-75.
165. Ordway, G.A. and D.J. Garry, *Myoglobin: an essential hemoprotein in striated muscle*. The Journal of experimental biology, 2004. **207**(Pt 20): p. 3441-6.
166. Zager, R.A. and K. Burkhart, *Myoglobin toxicity in proximal human kidney cells: roles of Fe, Ca²⁺, H₂O₂, and terminal mitochondrial electron transport*. Kidney international, 1997. **51**(3): p. 728-38.
167. Zager, R.A., et al., *Iron, heme oxygenase, and glutathione: effects on myohemoglobinuric proximal tubular injury*. Kidney international, 1995. **48**(5): p. 1624-34.
168. Reeder, B.J. and M.T. Wilson, *Hemoglobin and myoglobin associated oxidative stress: from molecular mechanisms to disease States*. Current medicinal chemistry, 2005. **12**(23): p. 2741-51.
169. Sakhaee, K., *Recent advances in the pathophysiology of nephrolithiasis*. Kidney international, 2009. **75**(6): p. 585-95.
170. Siow, R.C., H. Sato, and G.E. Mann, *Heme oxygenase-carbon monoxide signalling pathway in atherosclerosis: anti-atherogenic actions of bilirubin and carbon monoxide?* Cardiovascular research, 1999. **41**(2): p. 385-94.
171. Agarwal, A. and H.S. Nick, *Renal response to tissue injury: lessons from heme oxygenase-1 GeneAblation and expression*. Journal of the American Society of Nephrology : JASN, 2000. **11**(5): p. 965-73.
172. Nath, K.A., et al., *Induction of heme oxygenase is a rapid, protective response in rhabdomyolysis in the rat*. The Journal of clinical investigation, 1992. **90**(1): p. 267-70.
173. Nath, K.A., et al., *The indispensability of heme oxygenase-1 in protecting against acute heme protein-induced toxicity in vivo*. The American journal of pathology, 2000. **156**(5): p. 1527-35.
174. Ferenbach, D.A., et al., *Macrophages expressing heme oxygenase-1 improve renal function in ischemia/reperfusion injury*. Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy, 2010. **18**(9): p. 1706-13.
175. Kawashima, A., et al., *Heme oxygenase-1 deficiency: the first autopsy case*. Human pathology, 2002. **33**(1): p. 125-30.

176. Zarjou, A., et al., *Proximal tubule H-ferritin mediates iron trafficking in acute kidney injury*. The Journal of clinical investigation, 2013. **123**(10): p. 4423-34.
177. Wang, Z., et al., *Inhibition of cytochrome P450 2E1 and activation of transcription factor Nrf2 are renoprotective in myoglobinuric acute kidney injury*. Kidney international, 2014.
178. Sever, M.S. and R. Vanholder, *Management of crush victims in mass disasters: highlights from recently published recommendations*. Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN, 2013. **8**(2): p. 328-35.
179. Abul-Ezz, S.R., P.D. Walker, and S.V. Shah, *Role of glutathione in an animal model of myoglobinuric acute renal failure*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1991. **88**(21): p. 9833-7.
180. Fernandez-Funez, A., et al., *Effects of N-acetylcysteine on myoglobinuric-acute renal failure in rats*. Renal failure, 2002. **24**(6): p. 725-33.
181. Kim, J.H., et al., *N-acetylcysteine attenuates glycerol-induced acute kidney injury by regulating MAPKs and Bcl-2 family proteins*. Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association, 2010. **25**(5): p. 1435-43.
182. Kim, Y.S., et al., *Glutamine attenuates tubular cell apoptosis in acute kidney injury via inhibition of the c-Jun N-terminal kinase phosphorylation of 14-3-3*. Critical care medicine, 2009. **37**(6): p. 2033-44.
183. Ustundag, S., et al., *L-Carnitine ameliorates glycerol-induced myoglobinuric acute renal failure in rats*. Renal failure, 2009. **31**(2): p. 124-33.
184. Liu, Y., et al., *L-citrulline protects against glycerol-induced acute renal failure in rats*. Renal failure, 2013. **35**(3): p. 367-73.
185. Singh, D., V. Chander, and K. Chopra, *Carvedilol, an antihypertensive drug with antioxidant properties, protects against glycerol-induced acute renal failure*. American journal of nephrology, 2003. **23**(6): p. 415-21.
186. Chander, V., D. Singh, and K. Chopra, *Reversal of experimental myoglobinuric acute renal failure in rats by quercetin, a bioflavonoid*. Pharmacology, 2005. **73**(1): p. 49-56.
187. Chander, V. and K. Chopra, *Protective effect of resveratrol, a polyphenolic phytoalexin on glycerol-induced acute renal failure in rat kidney*. Renal failure, 2006. **28**(2): p. 161-9.
188. Subeq, Y.M., et al., *Pentobarbital reduces rhabdomyolysis-induced acute renal failure in conscious rats*. The Journal of trauma, 2009. **67**(1): p. 132-8.
189. Wang, Y.D., et al., *Fasudil ameliorates rhabdomyolysis-induced acute kidney injury via inhibition of apoptosis*. Renal failure, 2011. **33**(8): p. 811-8.
190. Gu, H., et al., *Pretreatment with hydrogen-rich saline reduces the damage caused by glycerol-induced rhabdomyolysis and acute kidney injury in rats*. The Journal of surgical research, 2014. **188**(1): p. 243-9.
191. Korrapati, M.C., B.E. Shaner, and R.G. Schnellmann, *Recovery from glycerol-induced acute kidney injury is accelerated by suramin*. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics, 2012. **341**(1): p. 126-36.
192. Boutaud, O., et al., *Acetaminophen inhibits hemoprotein-catalyzed lipid peroxidation and attenuates rhabdomyolysis-induced renal failure*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2010. **107**(6): p. 2699-704.

193. Shanu, A., et al., *Selenium inhibits renal oxidation and inflammation but not acute kidney injury in an animal model of rhabdomyolysis*. Antioxidants & redox signaling, 2013. **18**(7): p. 756-69.
194. Yang, F.L., et al., *Recombinant human erythropoietin reduces rhabdomyolysis-induced acute renal failure in rats*. Injury, 2012. **43**(3): p. 367-73.
195. Homsí, E., P. Janino, and J.B. de Faria, *Role of caspases on cell death, inflammation, and cell cycle in glycerol-induced acute renal failure*. Kidney international, 2006. **69**(8): p. 1385-92.
196. Tang, W.X., et al., *Amelioration of rhabdomyolysis-induced renal mitochondrial injury and apoptosis through suppression of Drp-1 translocation*. Journal of nephrology, 2013: p. 0.
197. Tsurkan, M.V., et al., *Growth factor delivery from hydrogel particle aggregates to promote tubular regeneration after acute kidney injury*. Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society, 2013. **167**(3): p. 248-55.
198. Herrera, M.B., et al., *Mesenchymal stem cells contribute to the renal repair of acute tubular epithelial injury*. International journal of molecular medicine, 2004. **14**(6): p. 1035-41.
199. Herrera, M.B., et al., *Exogenous mesenchymal stem cells localize to the kidney by means of CD44 following acute tubular injury*. Kidney international, 2007. **72**(4): p. 430-41.
200. Hauser, P.V., et al., *Stem cells derived from human amniotic fluid contribute to acute kidney injury recovery*. The American journal of pathology, 2010. **177**(4): p. 2011-21.
201. Repizo, L.P., et al., *Biopsy proven acute tubular necrosis due to rhabdomyolysis in a dengue fever patient: a case report and review of literature*. Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo, 2014. **56**(1): p. 85-8.
202. Sinniah, R. and W. Lye, *Acute renal failure from myoglobinuria secondary to myositis from severe falciparum malaria*. American journal of nephrology, 2000. **20**(4): p. 339-43.
203. Wei, Q., et al., *Heme oxygenase-1 induction contributes to renoprotection by G-CSF during rhabdomyolysis-associated acute kidney injury*. American journal of physiology. Renal physiology, 2011. **301**(1): p. F162-70.
204. Kapturczak, M.H., et al., *Heme oxygenase-1 modulates early inflammatory responses: evidence from the heme oxygenase-1-deficient mouse*. The American journal of pathology, 2004. **165**(3): p. 1045-53.
205. Blancou, P. and I. Anegón, *Editorial: Heme oxygenase-1 and dendritic cells: what else?* Journal of leukocyte biology, 2010. **87**(2): p. 185-7.
206. Hull, T.D., A. Agarwal, and J. George, *The Mononuclear Phagocyte System in Homeostasis and Disease: A Role for Heme Oxygenase-1*. Antioxidants & redox signaling, 2013.
207. Philippidis, P., et al., *Hemoglobin scavenger receptor CD163 mediates interleukin-10 release and heme oxygenase-1 synthesis: antiinflammatory monocyte-macrophage responses in vitro, in resolving skin blisters in vivo, and after cardiopulmonary bypass surgery*. Circulation research, 2004. **94**(1): p. 119-26.
208. Buechler, C., et al., *Regulation of scavenger receptor CD163 expression in human monocytes and macrophages by pro- and antiinflammatory stimuli*. Journal of leukocyte biology, 2000. **67**(1): p. 97-103.

209. Ndisang, J.F. and A. Jadhav, *Hemin therapy improves kidney function in male streptozotocin-induced diabetic rats: role of the heme oxygenase/atrial natriuretic peptide/adiponectin axis*. *Endocrinology*, 2014. **155**(1): p. 215-29.
210. Geng, Y., et al., *Mesenchymal stem cells ameliorate rhabdomyolysis-induced acute kidney injury via the activation of M2 macrophages*. *Stem cell research & therapy*, 2014. **5**(3): p. 80.
211. Mulay, S.R., et al., *Calcium oxalate crystals induce renal inflammation by NLRP3-mediated IL-1 β secretion*. *The Journal of clinical investigation*, 2013. **123**(1): p. 236-46.
212. Tomioka, H. and H. Saito, *Characterization of immunosuppressive functions of murine peritoneal macrophages induced with various agents*. *Journal of leukocyte biology*, 1992. **51**(1): p. 24-31.
213. Han, Y.J., et al., *Antioxidant enzymes suppress nitric oxide production through the inhibition of NF- κ B activation: role of H₂O₂ and nitric oxide in inducible nitric oxide synthase expression in macrophages*. *Nitric oxide : biology and chemistry / official journal of the Nitric Oxide Society*, 2001. **5**(5): p. 504-13.
214. Helmy, M.M. and H.M. El-Gowell, *Montelukast abrogates rhabdomyolysis-induced acute renal failure via rectifying detrimental changes in antioxidant profile and systemic cytokines and apoptotic factors production*. *European journal of pharmacology*, 2012. **683**(1-3): p. 294-300.
215. Arnold, L., et al., *Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis*. *The Journal of experimental medicine*, 2007. **204**(5): p. 1057-69.
216. Canton, J., *Phagosome maturation in polarized macrophages*. *Journal of leukocyte biology*, 2014.
217. Rieger, E., et al., *Intraperitoneal glycerol induces oxidative stress in rat kidney*. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*, 2008. **35**(8): p. 928-33.
218. Summan, M., et al., *Macrophages and skeletal muscle regeneration: a clodronate-containing liposome depletion study*. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 2006. **290**(6): p. R1488-95.
219. Kohno, Y. and J.A. Berzofsky, *Genetic control of immune response to myoglobin. Ir gene function in genetic restriction between T and B lymphocytes*. *The Journal of experimental medicine*, 1982. **156**(5): p. 1486-501.
220. Liu, L., et al., *CD4⁺ T Lymphocytes, especially Th2 cells, contribute to the progress of renal fibrosis*. *American journal of nephrology*, 2012. **36**(4): p. 386-96.
221. Niedermeier, M., et al., *CD4⁺ T cells control the differentiation of Gr1⁺ monocytes into fibrocytes*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009. **106**(42): p. 17892-7.
222. Barrera-Chimal, J., et al., *Spironolactone prevents chronic kidney disease caused by ischemic acute kidney injury*. *Kidney international*, 2013. **83**(1): p. 93-103.
223. Newham, P., et al., *Alpha4 integrin binding interfaces on VCAM-1 and MAdCAM-1. Integrin binding footprints identify accessory binding sites that play a role in integrin specificity*. *The Journal of biological chemistry*, 1997. **272**(31): p. 19429-40.
224. Swerlick, R.A., et al., *Regulation of vascular cell adhesion molecule 1 on human dermal microvascular endothelial cells*. *Journal of immunology*, 1992. **149**(2): p. 698-705.

225. Sironi, M., et al., *Regulation of endothelial and mesothelial cell function by interleukin-13: selective induction of vascular cell adhesion molecule-1 and amplification of interleukin-6 production*. Blood, 1994. **84**(6): p. 1913-21.
226. Morisaki, N., et al., *Specific inhibition of vascular cell adhesion molecule-1 expression by type IV collagen in endothelial cells*. Biochemical and biophysical research communications, 1995. **214**(3): p. 1163-7.
227. McAteer, M.A., et al., *In vivo magnetic resonance imaging of acute brain inflammation using microparticles of iron oxide*. Nature medicine, 2007. **13**(10): p. 1253-8.
228. Gauberti, M., et al., *Ultra-sensitive molecular MRI of vascular cell adhesion molecule-1 reveals a dynamic inflammatory penumbra after strokes*. Stroke; a journal of cerebral circulation, 2013. **44**(7): p. 1988-96.
229. Montagne, A., et al., *Ultra-sensitive molecular MRI of cerebrovascular cell activation enables early detection of chronic central nervous system disorders*. NeuroImage, 2012. **63**(2): p. 760-70.
230. Zhu, L., et al., *Increased plasma sVCAM-1 is associated with severity in IgA nephropathy*. BMC nephrology, 2013. **14**: p. 21.
231. Skeoch, S., et al., *Cell adhesion molecules as potential biomarkers of nephritis, damage and accelerated atherosclerosis in patients with SLE*. Lupus, 2014. **23**(8): p. 819-824.
232. Clausen, P., et al., *Plasma concentrations of VCAM-1 and ICAM-1 are elevated in patients with Type 1 diabetes mellitus with microalbuminuria and overt nephropathy*. Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association, 2000. **17**(9): p. 644-9.
233. Rubio-Guerra, A.F., et al., *Correlation between circulating adhesion molecule levels and albuminuria in type-2 diabetic hypertensive patients*. Kidney & blood pressure research, 2009. **32**(2): p. 106-9.
234. Singh, S., et al., *Urine VCAM-1 as a marker of renal pathology activity index in lupus nephritis*. Arthritis research & therapy, 2012. **14**(4): p. R164.
235. Solez, K., et al., *Adhesion molecules and rejection of renal allografts*. Kidney international, 1997. **51**(5): p. 1476-80.
236. Ina, K., et al., *Vascular cell adhesion molecule-1 expression in the renal interstitium of diabetic KKAY mice*. Diabetes research and clinical practice, 1999. **44**(1): p. 1-8.
237. Allen, A.R., et al., *Endothelial expression of VCAM-1 in experimental crescentic nephritis and effect of antibodies to very late antigen-4 or VCAM-1 on glomerular injury*. Journal of immunology, 1999. **162**(9): p. 5519-27.
238. Seron, D., J.S. Cameron, and D.O. Haskard, *Expression of VCAM-1 in the normal and diseased kidney*. Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association, 1991. **6**(12): p. 917-22.
239. Lin, Y., et al., *Renal allograft rejection: expression and function of VCAM-1 on tubular epithelial cells*. Clinical and experimental immunology, 1993. **92**(1): p. 145-51.
240. Akhtar, A.M., et al., *In vivo quantification of VCAM-1 expression in renal ischemia reperfusion injury using non-invasive magnetic resonance molecular imaging*. PloS one, 2010. **5**(9): p. e12800.
241. Taal, M.W., et al., *Proinflammatory gene expression and macrophage recruitment in the rat remnant kidney*. Kidney international, 2000. **58**(4): p. 1664-76.

242. Sakhalkar, H.S., et al., *Leukocyte-inspired biodegradable particles that selectively and avidly adhere to inflamed endothelium in vitro and in vivo*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003. **100**(26): p. 15895-900.
243. Chen, H.H., et al., *MR imaging of biodegradable polymeric microparticles: a potential method of monitoring local drug delivery*. Magnetic resonance in medicine : official journal of the Society of Magnetic Resonance in Medicine / Society of Magnetic Resonance in Medicine, 2005. **53**(3): p. 614-20.
244. Milman, Z., et al., *Assessment with unenhanced MRI techniques of renal morphology and hemodynamic changes during acute kidney injury and chronic kidney disease in mice*. American journal of nephrology, 2014. **39**(3): p. 268-78.

Résumé

Les données épidémiologiques ont établi qu'une agression rénale aiguë (ARA) pouvait favoriser l'émergence d'une maladie rénale chronique. Certains phénomènes immunologiques y contribuent. Parmi les événements mis en jeu, la réponse inflammatoire est un déterminant pronostique majeur de l'apparition de lésions de fibrose et implique notamment les macrophages (MØ), cellules hétérogènes et plastiques, dont le phénotype s'établit entre deux extrêmes : M1 (classiquement activé, pro-inflammatoire) ou M2 (alternativement activé, réparateur). L'ARA secondaire à une rhabdomyolyse (lésion du muscle strié squelettique), est une situation clinique fréquente, principalement expliquée par le rôle délétère sur le tubule rénal de la myoglobine libérée par le muscle. Dans la situation d'ARA expérimentale succédant à une rhabdomyolyse, nos objectifs étaient : (i) de décrire la polarisation et le rôle des MØ, où l'infiltration tissulaire rénale par les MØ a été montrée, sans que leur fonction biologique n'ait été définie; (ii) de caractériser les conséquences morphologiques et fonctionnelles tardives.

Alors que les données histologiques humaines sont parcellaires dans la rhabdomyolyse, nous avons mis en évidence un infiltrat significatif de MØ sur une biopsie rénale d'un patient admis après une rhabdomyolyse d'origine toxique. Nous avons confirmé cette donnée dans le modèle murin de rhabdomyolyse induite par le glycérol. Le phénotype des MØ est apparu hétérogène (ces cellules présentant une grande diversité au-delà de leur identité). Par cytométrie en flux, nous avons établi qu'en situation d'homéostasie, les MØ sont de type R2 (F4/80^{hi}CD11b⁺). A J2 après rhabdomyolyse, une recrudescence de MØ de type R1 (F4/80^{lo}CD11b^{hi}) est notée, alors qu'à J8, le phénotype dominant redevient R2 (F4/80^{hi}CD11b⁺), mais enrichi en CD206 (marqueur de réparation, M2). L'exposition à la myoglobine *in vitro* entraîne l'expression par les cellules rénales de cytokines recrutant les MØ, et une polarisation « mixte » des MØ, simultanément M1 et M2. Pour mieux caractériser les états de transition des MØ, une étude transcriptionnelle a été réalisée à l'échelle de la cellule isolée *in vivo*. Nous montrons que la rhabdomyolyse est une situation d'activation des MØ, et que R1 et R2 ont des caractéristiques bien distinctes : alors que les R1 expriment des cibles de l'inflammation et des marqueurs M2 dont la fibronectine, les R2 expriment des cibles de réparation et d'inflammation suggérant un phénotype M2b. Enfin, nous avons réalisé des études fonctionnelles en déplaçant les MØ avec du clodronate liposomal (CL). Le traitement par CL réduit la mortalité liée à la rhabdomyolyse et la sévérité de l'ARA en matière de structure et de fonction. La déplétion de la population R1 s'accompagne d'une réduction des cytokines pro-inflammatoires (CCL-2, CCL-7) et de certains composants de la matrice extra-cellulaire (fibronectine, collagène). A long terme, un et sept mois après rhabdomyolyse, nous observons des séquelles chroniques d'ARA, ce qui n'avait jamais été observé. Le fait de réduire l'inflammation initiale avec le CL se révèle bénéfique. Ainsi, nous décrivons pour la première fois l'implication des MØ dans les lésions rénales liée à une rhabdomyolyse.

En parallèle de ce travail, nous nous sommes intéressés aux molécules d'adhésion endothéliales qui permettent l'extravasation des leucocytes (dont les MØ) dans les tissus agressés, en particulier VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1). Nous avons appliqué une technique non-invasive de mesure de l'inflammation par imagerie moléculaire anti VCAM-1 à l'étude de différents modèles d'ARA et de maladie rénale chronique (note technique en annexe).

En résumé, ce travail établit clairement l'importance des phénomènes inflammatoires et le rôle des MØ dans une situation d'ARA expérimentale. L'usage précoce de modulateurs de l'inflammation prévient l'installation de séquelles définitives.